

VEDEN RAVINNEPITOISUUDEN VAIKUTUS
MAKROLEVIEN LIPIDIMÄÄRÄÄN JA
RASVAHAPPOKOOSTUMUKSEEN

JANNI JERNSTRÖM

HELSINGIN YLIOPISTO
YMPÄRISTÖTIETEIDEN LAITOS
AKVAATTISET TIETEET
MERIBIOLOGIA
PRO GRADU – TUTKIELMA
20.1.2015



Tiedekunta – Fakultet – Faculty Bio- ja ympäristötieteellinen tiedekunta		Laitos – Institution– Department Ympäristötieteiden laitos	
Tekijä – Författare – Author Janni Jernström			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Veden ravinnepitoisuuden vaikutus makrolevien lipidimäärään ja rasvahappokoostumukseen			
Oppiaine – Läroämne – Subject Akvaattiset tieteet, Meribiologia			
Työn laji – Arbetets art – Level Pro gradu		Aika – Datum – Month and year Tammikuu 2015	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 56
Tiivistelmä – Referat – Abstract			
<p>Makrolevien kemiallinen koostumus vaihtelee paljon lajien, elinympäristön ja ympäristötekijöiden mukaan. Erityisesti makrolevien lipidimäärä vaihtelee vuodenaikojen ja eri ympäristömuuttujien, kuten valon, ravinteiden, suolaisuuden ja lämpötilan mukaan. Makrolevien lipidit voidaan jakaa varastolipideihin eli neutraaleihin lipideihin, glykolipideihin ja fosfolipideihin. Talvella ja keväällä makrolevät sisältävät enemmän lipidejä kuin kesällä. Kylmissä vesissä makrolevät sisältävät enemmän monitydyttymättömiä rasvahappoja (PUFA, polyunsaturated fatty acid) kuin lämpimien vesien levät. Niukkaravinteisuus lisää makrolevien lipidien tuotantoa perustuotannon kustannuksella. Makroleväryhmiä ruskolevät (Phaeophyceae) sisältävät enemmän lipidejä kuin viherlevät (Chlorophyta) ja punalevät (Rhodophyta). Makrolevien lipideistä erityisesti neutraaleista lipideistä ollaan kiinnostuneita biopoltoaineiden raaka-aineena. Neutraalilipideistä triasyyliglyserolit (TAG) ovat hyvä biodieselin raaka-aine. Tutkimuksessa selvitettiin Itämeren makrolevien soveltavuutta biodieselin raaka-aineeksi. Samalla tutkittiin, miten veden erilaiset ravinnepitoisuudet vaikuttavat makrolevien lipidimäärään ja rasvahappokoostumukseen. Tutkimuksen oletuksena oli, että makrolevät tuottavat enemmän lipidejä niukkaravinteisissä kuin ravinnepitoisissa olosuhteissa. Kokeessa tutkittiin myös makroleväryhmien välisiä eroja lipidimäärissä.</p> <p>Kokeessa tutkittiin <i>Ulva intestinalis</i> ja <i>Cladophora glomerata</i> -viherlevien sekä <i>Ceramium tenuicorne</i> -punalevän lipidimäärää ja rasvahappokoostumusta, koska kyseiset levälajit ovat yleisiä makrolevälajeja Itämeren litoraalityöhykkeessä. Akvaariokokeet toteutettiin elokuussa sekä lokakuussa 10 päivää kestävässä faktorikokeena Tvärminnen eläintieteellisellä asemalla. Koejärjestelyssä ravinnepitoisuuksia käytettiin kontrolli- (C), tyypillisäys- (N), fosforilisäys- (P) ja typen ja fosforin yhteisvaikutuksen käsittelyitä (N+P). Makrolevien lipidit eristettiin kloroformi:metanoli (2:1 -vol/vol) -liuoksella. Makrolevien lipidit ja rasvahappokoostumus määritettiin kaasukromatografi-massaspektrometrin (GC-MS) avulla lipidien metyloiduista rasvahapon metyyliesteistä (FAME, fatty acid methyl ester). Kokonaislipideistä fraktioitiin neutraalilipidit, jotta pystyttiin arvioimaan makrolevien soveltavuutta biodieselin raaka-aineeksi.</p> <p>Makrolevien kokonaislipidimäärät erosivat lajeittain, mutta eivät käsittelyittäin toisistaan. Makrolevien kokonaislipidimäärät vaihtelivat välillä 31–193 mg l⁻¹ siten, että lokakuussa <i>U. intestinalis</i> -viherlevä sisälsi vähiten kokonaislipidejä verrattuna muihin tutkittuihin makroleviin. Tutkittujen makrolevien kokonaislipidimäärät käsittivät vain alle 2% makrolevien kuivapainosta. Makrolevien kokonaisrasvahappomäärät erosivat toisistaan lajeittain, mutta eivät käsittelyittäin. Makrolevien kokonaisrasvahappomäärät vaihtelivat välillä 0,7-9,0 mg l⁻¹ siten, että pienimmät määrät löytyivät lokakuun <i>U. intestinalis</i> -viherlevältä ja suurimmat määrät <i>C. glomerata</i> -viherlevältä. Makrolevien rasvahappokoostumukset erosivat hieman toisistaan, mutta tyydyttyneet rasvahapot (SFA, saturated fatty acid) olivat makrolevälajien suurin rasvahapporyhmä (42,0–49,7%). Elokuun ja lokakuun <i>U. intestinalis</i> -viherlevät sisälsivät enemmän monitydyttymättömiä rasvahappoja (45,1%; 46,9%) kuin <i>C. glomerata</i> (23,2%) ja <i>C. tenuicorne</i> (22,8%) -levät. Kaikilla tutkituilla makrolevälajeilla rasvahapon C16:0 osuus oli korkein (32,3–45,7 % kokonaisrasvahapoista). <i>U. intestinalis</i> -viherlevän eri tutkimusajankohtina mitatut neutraalilipidifraktion rasvahappomäärät erosivat toisistaan merkitsevästi, mutta ravinnepitoisuudet eivät vaikuttaneet neutraalilipidifraktion rasvahappomääriin. Neutraalilipidifraktion rasvahappomäärät olivat pienet ja ne vaihtelivat välillä 0,6-4,2 mg l⁻¹. Elokuun ja lokakuun <i>U. intestinalis</i> -levän neutraalilipidifraktioiden rasvahappokoostumuksissa ei havaittu eroja.</p> <p>Tutkimuksen makrolevälajien kokonaislipidimäärät erosivat muiden tutkimuksien tuloksista, koska makrolevien näytteenottoajankohta sekä näytteenottoaika vaikuttavat makrolevien lipidimääriin. Lokakuun <i>U. intestinalis</i> -viherlevän alhainen lipidimäärä voi selittyä sillä, että viherlevä ei ollut enää myöhään syksyllä elinvoimainen, joten makroleväryhmien välisiä lipidimäärän eroja oli vaikea todeta. Tutkitut makrolevälajit eivät tuottaneet merkitsevästi enemmän lipidejä niukkaravinteisissä kuin ravinnepitoisissa olosuhteissa. Kontrolli- ja fosforilisäyskäsittelyissä makrolevien väri muuttui haaleammaksi eli levät eivät saaneet tarpeeksi typpeä klorofyllin tuotantoon. Makrolevälajien olisi mahdollisesti voinut antaa sopeutua uusiin olosuhteisiin ennen kokeen alkua. Akvaariokokeiden erilainen veden lämpötila elo- ja lokakuun kokeissa saattoi vaikuttaa enemmän makrolevien kokonaislipidimäärään kuin ravinnepitoisuudet. Makrolevälajien alhainen rasvahappojen määrä tukee muiden tutkimuksien tuloksia, joissa lipidiryhmistä poolisia lipidejä on eniten. Suuri tyydyttyneiden rasvahappojen osuus kertoo, että tutkitut makrolevälajit olivat stressaantuneita. <i>U. intestinalis</i> -viherlevän neutraalilipidifraktion rasvahappomäärä suhteessa kokonaislipidimäärään oli pieni.</p> <p>Makrolevät voisivat olla sovelias raaka-aine biodieselin tuotantoon korkean kokonaislipidimäärän ja tyydyttyneiden rasvahappojen osuuden vuoksi. Näiden ominaisuuksien avulla voitaisiin valmistaa hyvälaatuista biodieseliä. Makrolevät olisi mahdollista saada tuottamaan enemmän lipidejä niukkaravinteisissä kuin ravinnepitoisissa olosuhteissa, jos valittaisiin oikeat makrolevälajit ja näytteenottoajankohta olisi otollinen lipidien tuotantoon. Makrolevien lipidituotantoa voisi nostaa myös kaksivaiheisen kasvatustavan kautta, kuten <i>Chlorella vulgaris</i> -mikrolevällä lipidituotannon paraneminen on osoitettu. Makrolevien perustuotantoa voisi mahdollisesti lisätä ravinnepitoisissa olosuhteissa, jonka jälkeen makrolevät siirrettäisiin niukkaravinteisiin olosuhteisiin lipidituotannon parantamiseksi.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords <i>Ceramium tenuicorne</i> , <i>Cladophora glomerata</i> , neutraalilipidit, rasvahappokoostumus, rasvahapon metyyliesteri (FAME), <i>Ulva intestinalis</i>			
Ohjaaja tai ohjaajat – Handledare – Supervisor or supervisors Elina Leskinen ja Milla Suutari			
Säilytyspaikka – Förvaringsställe – Where deposited Viikin kampuskirjasto			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			



Tiedekunta – Fakultet – Faculty Faculty of Biological and Environmental Sciences		Laitos – Institution – Department Department of Environmental Sciences	
Tekijä – Författare – Author Janni Jernström			
Työn nimi – Arbetets titel – Title The effect of nutrient concentration on the total lipid content and fatty acid composition of macroalgae			
Oppiaine – Läroämne – Subject Aquatic Sciences, Marine Biology			
Työn laji – Arbetets art – Level Master's Thesis		Aika – Datum – Month and year January 2015	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 56
Tiivistelmä – Referat – Abstract			
<p>The chemical composition of macroalgae varies between species, habitat and environmental conditions. The lipid content of macroalgae changes between seasons and different environmental factors such as light, nutrient levels and temperature. The lipid levels are higher during winter and spring than in the summer. Macroalgae from the cold water are richer in polyunsaturated fatty acids (PUFAs) than macroalgae from the warm waters. Nutrient limitation increases the synthesis of lipids in macroalgae. Studies show also that brown macroalgae (Phaeophyceae) have higher lipid content than green (Chlorophyta) and red (Rhodophyta) macroalgae. Macroalgae produce neutral lipids mainly triacylglycerols (TAGs) under stress condition so they shift from membrane lipid synthesis to storage lipid synthesis. The content of triacylglycerols in macroalgae is of interest because triacylglycerols can be used as bases of biodiesel.</p> <p>In the experiment we wanted to define the application of Baltic Sea macroalgae as raw material for biodiesel. We also studied how the different levels of nutrients affect the content of total lipids and fatty acid composition in the studied macroalgae. The hypothesis was that the studied macroalgae would produce more lipids in nutrient limited conditions than in nutrient replete conditions. At the same time, the differences between the content of lipids between macroalgae species was examined.</p> <p>Two green macroalgae and one red macroalgae species were used in the experiment (<i>Ulva intestinalis</i>, <i>Cladophora glomerata</i> and <i>Ceramium tenuicorne</i>) to study the total lipid content and the fatty acid composition of the macroalgae. The macroalgae species were selected because they are typical macroalgae species in the Baltic Sea's littoral zone. The experiment was conducted as a factor experiment for 10 days in August and October in the Tvärminne Zoological Station. The experiments nutrient treatments were designed as to study the effect of nitrogen and phosphorus separately and together on macroalgae lipid content. The macroalgae lipids were extracted with chloroform:methanol (2:1 -vol/vol) mixture. The macroalgae lipids and the fatty acid composition were studied with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) from extracted and esterified fatty acid methyl esters (FAMES). We also fractionated the neutral lipids from the total lipids to quantify the amount of neutral lipids.</p> <p>The total lipid content of the studied macroalgae species varied between specie but not between nutrient treatments. The total lipids contents ranged from 31 to 193 mg l⁻¹, with the lowest total lipid content found in <i>U. intestinalis</i> in the October experiment. The total lipid content of the macroalgae accounted only 2% of the macroalgae species dry weight. The total fatty acid content of the studied macroalgae species ranged from 0,7 to 9,0 mg l⁻¹ with the highest values found in <i>C. glomerata</i> and the lowest in <i>U. intestinalis</i> in the October experiment. The total fatty acid content differed between species but not between nutrient treatments. The fatty acid composition of the macroalgae varied slightly but there were similarities between the fatty acid compositions between the studied species. The saturated fatty acid contents were the highest among the studied macroalgae (42,0-49,7%). <i>U. intestinalis</i> in the August and October experiment contained more polyunsaturated fatty acids (PUFAs) (45,1%; 46,9%) than <i>C. glomerata</i> (23,2%) and <i>C. tenuicorne</i> (22,8%). The major fatty acid was the palmitic acid (C16:0) in all the studied macroalgae species (32,3-45,7% of total fatty acids). The neutral lipid amount from <i>U. intestinalis</i> differed between August and October specimens but didn't differ between nutrient treatments. The neutral lipid content ranged from 0,6 to 4,2 mg l⁻¹ with the lowest amounts found in <i>U. intestinalis</i> from Octobers experiment. The fatty acid composition of the neutral lipids in <i>U. intestinalis</i> resembled one another.</p> <p>The total lipid content of the studied macroalgae was different from results of other studies made by macroalgae because the sampling location and the season affects the total lipid content of macroalgae. The low amounts of total lipids and fatty acids in <i>U. intestinalis</i> in October can be explained by the fact, that <i>U. intestinalis</i> was not healthy at the time of the experiment. Comparing the total lipid contents of the macroalgae is therefore difficult because of the rundown nature of the <i>U. intestinalis</i> in October. The studied macroalgae didn't contain the highest amounts of lipids in the nutrient deprived conditions because the macroalgae experienced shortage of nitrogen for example in the control and added phosphorus treatments. The macroalgae should have been given the opportunity to adjust to the new conditions before the experiment. The different water temperature between the August and October experiment could account more of the differences between the total lipid content of the macroalgae than the nutrient treatments. The fatty acid composition of the macroalgae was similar to those reported from other studied. The low amount of fatty acids supports the findings of the studies because typically most lipids are bound to membranes such as glycolipids and phospholipids. On the other hand, the high saturated fatty acid content reveals that the macroalgae were in stress conditions.</p> <p>The macroalgae are suited as raw material for biodiesel because of the high total lipid and saturated fatty acid content of the macroalgae species. The macroalgae could be grown to produce more lipids in nutrient deprived than in nutrient saturated conditions by choosing the suited macroalgae and the optimal sampling season. The total lipid content of macroalgae can be enhanced with two-stage nitrogen supply growth strategy which has been demonstrated in the microalgae <i>Chlorella vulgaris</i>. In the first stage the macroalgae could be grown in nitrogen replete conditions to optimize biomass productivity. In the second stage the macroalgae would be grown in nitrogen limited conditions to increase lipid content.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords <i>Ceramium tenuicorne</i> , <i>Cladophora glomerata</i> , fatty acid composition, fatty acid methyl ester (FAME), neutral lipids, <i>Ulva intestinalis</i>			
Ohjaaja tai ohjaajat – Handledare – Supervisor or supervisors Elina Leskinen ja Milla Suutari			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Viikki Campus Library			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

Sisällysluettelo

1. Lyhenteet.....	3
2. Johdanto	4
2.1 Makrolevät Itämeressä ja valtamerissä	4
2.2 Levien kemiallinen koostumus	6
2.3 Lipidit ja rasvahapot.....	8
2.4 Makrolevien lipidien ja rasvahappojen esiintyminen.....	10
2.5 Mikrolevät.....	11
2.6 Makrolevien hyötykäyttöä	13
2.6.1 Biopolttoaineet	14
3. Aineisto ja menetelmät.....	17
3.1 Koejärjestely	17
3.2 Makrolevien esikäsittely	19
3.3 Lipidien eristys.....	19
3.4 Kaasukromatografi-massaspektrometri.....	20
3.4.1 Näytteiden analysointi kaasukromatografi-massaspektrometrilla.....	21
3.5 Kokonaisrasvahappojen metylaatio	22
3.6 Fraktioinnin testaus	23
3.7 Näytteiden neutraalilipidien fraktiointi	26
3.8 Tilastolliset testit	26
4. Tulokset.....	27
4.1 Makrolevien märkäpaino ja kuivapaino.....	27
4.2 Vesinäytteiden ravinnepitoisuus	29
4.3 Makrolevien kokonaislipidit	32
4.4 Makrolevien rasvahapot	34
4.5 Makrolevien rasvahappojen pääkomponenttianalyysi	37
4.6 <i>Ulva intestinalis</i> neutraalilipidit	38

5. Tulosten tarkastelu	41
5.1 Akvaariokokeen aikana havaitut muutokset	41
5.2 Makrolevien kokonaislipidit	41
5.3 Makrolevien rasvahappokoostumus.....	44
5.4 <i>Ulva intestinalis</i> -levän neutraalilipidit	46
5.5 Makrolevät biodieselin raaka-aineeksi.....	46
6. Yhteenveto	47
Kiitokset.....	48
Kirjallisuus.....	48
Liitteet	55
Liite 1. Koejärjestelmä elokuussa ja lokakuussa.....	55
Liite 2. Rasvahappojen metyyliestereiden sekoituksen koostumus (FAME 37).....	56

1. Lyhenteet

ALA	Alfalinoleenihappo (α -Linolenic acid methyl ester)
EFA	Välttämätön rasvahappo (Essential fatty acid)
FAME	Rasvahappometyyliesteri (Fatty acid methyl ester)
GC-MS	Kaasukromatografi-massaspektrometri (Gas chromatography-mass spectrometry)
MUFA	Kertatydyttymätön rasvahappo (Monounsaturated fatty acid)
PAR	Fotosynteettisesti aktiivinen säteily (Photosynthetically active radiation)
PCA	Pääkomponenttianalyysi (Principal component analysis)
PUFA	Monitydyttymätön rasvahappo (Polyunsaturated fatty acid)
SFA	Tyydyttynyt rasvahappo (Saturated fatty acid)
TAG	Triasyyliglyseroli (Triacylglycerol)

2. Johdanto

2.1 Makrolevät Itämeressä ja valtamerissä

Makrolevät ovat tärkeitä perustuottajia Itämeren ekosysteemeissä tarjoten sekä ravintoa että suojaa lukuisille selkärangattomille eläimille. Makrolevät ovat monimuotoinen joukko makroskooppisia yhteyttäviä leviä, jotka ovat fylogeneettisesti kaukana toisistaan. Makroleviä yhdistää niiden morfologinen rakenne, eli makrolevillä on sekovarsi ja ne ovat monisoluisia. Makrolevälajit lisääntyvät sekä suvuttomasti että suvullisesti.

Makrolevät voidaan jakaa fylogenian perusteella viherleviin (Chlorophyta), punaleviin (Rhodophyta) ja ruskoleviin (Phaeophyceae). Ne ovat suurimmaksi osaksi merellisiä lajeja, jotka elävät kivikkoisilla rannoilla tai kalliorannoilla. Itämeren kalliorannoilla makrolevät muodostavat levävyöhykkeitä, joiden lajiston koostumukseen vaikuttavat esimerkiksi rannan avoimuus, jään kulutus, veden ravinnepitoisuus, veden suolapitoisuus sekä valon määrä (Eriksson & Bergström 2005; Kautsky 1993; Kautsky ym. 1999; Kiirikki 1996).

Itämerellä kalliorannoilla on havaittavissa kolme levävyöhykettä, jotka eroavat lajistoltaan toisistaan. Hydrolitoraalissa sijaitsee rihmalevävyöhyke, jonka levälajien vuodenaikaisvaihtelu on suurta. Rihmalevävyöhykkeessä kasvaa yksivuotisia viherleviä, kuten *Cladophora glomerata* ja *Ulva intestinalis*, jotka esiintyvät vyöhykkeen valtalajeina kesän aikana (Mäkinen ym. 2008). Syksyllä punalevä *Ceramium tenuicorne* vallitsee rihmalevävyöhykettä yhdessä *Pylaiella littoralis* -ruskolevän kanssa. Rihmalevävyöhykkeessä levien välillä on kilpailua elintilasta ja riittävästä valon määrästä. Rihmalevävyöhykkeen leviin kohdistuu myös suuri laidunnuspaine selkärangattomista eläimistä, kuten siiroista ja katkoista.

Hydrolitoraalin alapuolella alkaa sublitoraali, jossa sijaitsee rakkolevävyöhyke (Mäkinen ym. 2008). Rakkolevävyöhykkeessä valtalajina esiintyy rakkolevä (*Fucus vesiculosus*). Rakkolevävyöhykkeessä kasvaa myös monivuotisia viherleviä, ruskoleviä ja punaleviä, jotka kilpailevat keskenään sopivasta elinympäristöstä sekä auringonvalosta. Rakkolevä on Itämeressä avainlaji, joka tarjoaa monille selkärangattomille eläimille ravintoa ja elinpaikan. Syvemmällä sublitoraalissa sijaitsee vielä punalevä-sinisimpukkavyöhyke, jonka yleisimpiä makrolevälajeja ovat *C. tenuicorne* ja *Furcellaria lumbricalis* -punalevät (Mäkinen ym. 2008). Punalevien joukosta löytyy myös paljon sinisimpukoita (*Mytilus trossulus x edulis*) ja merirokkoja (*Amphibalanus improvisus*).

Valtamerissä makrolevien vyöhykkeisyyteen vaikuttaa valon saanti, elintilasta kilpaileminen sekä vuoroveden muutoksiin sopeutuminen (Lüning 1990). Vuorovesirannoilla eliöiden vyöhykkeisyys on erityisen selvää. Litoraalityvyöhykkeen ylemmissä osissa makrolevien vyöhykkeisyyden määrittävät fyysiset stressitekijät, kuten aallokon vaikutus sekä levien kyky sietää kuivumista ja korkeita lämpötiloja (Underwood 1980). Alemmissa vyöhykkeissä bioottiset vuorovaikutukset, kuten lajienvälinen kilpailu ja saalistus, määräävät vyöhykkeiden syntyä (Underwood 1980; Underwood & Jernakoff 1984).

Makrolevävyöhykkeisyyteen vaikuttaa rannan avoimuus ja siten myös aallokko (Hawkins & Hartnoll 1983; Hawkins ym. 1992). Avoimilla rannoilla rannan litoraalityvyöhykkeet ovat leveämpiä kuin suojaisilla rannoilla, koska aaltojen pärskeet ulottuvat korkeammalle. Avoimilla rannoilla on vähemmän makroleviä kuin suojaisilla rannoilla, koska makrolevien sekovarret eivät kykene vastustamaan veden voimakasta liikettä. Suojaisilla rannoilla on paljon makroleviä, koska aaltojen voima ei riko makrolevien rakenteita.

Kelpit eli suuret ruskolevät sijaitsevat sublitoraalityvyöhykkeen eli vuoroveden alimman vedentason alapuolella, ylemmistä osista alarajaan saakka. Kelppimetsiä esiintyy lauhkean vyöhykkeen ravinteikkailta vesialueilla jopa 40 metrin syvyyteen asti (Lüning 1990). Valon tarve määrittää kelppilajin sijainnin vyöhykkeessä. Ruskolevien sekovarret ovat sopeutuneet kestämaan aallokon voimaa, ja ilmarakot eli pneumatokystit auttavat sekovartta venymään kohti pintaa. *Laminaria digitata* -ruskolevä kasvaa lähellä pintaa, koska sen sekovarsi on sopeutunut kestämaan aallokkoa ja ajoittaista kuivumista. Syvemmillä *Macrocystis pyrifera*, *Nereocystis luetkeana* ja *Ecklonia maxima* -ruskolevät muodostavat kelppikatoksen, joka saattaa ulottua pohjalta pinnalle *Laminaria digitata* -ruskolevän läheisyyteen asti (Bertness ym. 2001). Kelppikatoksen alla voi kasvaa pieniä viher- ja punaleviä.

Sublitoraalityvyöhykkeen alemmissa osissa makrolevälajien välinen kilpailu elintilasta määrittää levien vyöhykkeisyyden. Sublitoraalityvyöhykkeessä *Pelvetia canaliculata* -ruskolevä voisi kasvaa alemmissa vyöhykkeissä, mutta *Fucus spiralis* -ruskolevä tukahduttaa *P. canaliculata* -levän kasvamisen nopealla kasvullaan (Schonbeck & Norton 1980). Makrolevistä punalevät ovat sopeutuneet kasvamaan syvemmissä vyöhykkeissä kuin ruskolevät, koska ne tulevat toimeen vähäisemmällä valon määrällä. Kelppien vyöhykkeisyyden alarajan määrittää myös merisiilien (*Strongylocentrotus droebachiensis*) saalistus, koska alemmissa veden kerroksissa kelppeihin kohdistuu suurempi merisiilien saalistuspaine kuin matalammissa veden kerroksissa (Witman 1987).

Makrolevien vyöhykkeisyys on erityisen selvää Yhdysvaltojen länsirannikolla Kaliforniassa kelpimetsäyhteisössä, jossa kelpit ovat sopeutuneet omiin vyöhykkeisiinsä rannikon tuntumasta avomerelle (Lüning 1990). Matalammissa vesissä kasvavat *Nereocystis luetkeana* ja *Macrocystis pyrifera* -ruskolevät, kun taas syvemmissä vesissä tavataan *Egregia menziesii* ja *Pelagophycus porra* -ruskoleviä.

Sublitoraalivyöhykkeen makrolevien koostumukseen vaikuttaa maantieteellinen sijainti (Bertness ym. 2001). Lauhkean vyöhykkeen kelpimetsäyhteisöissä kelpilajit kuten *Saccharina latissima*, *Laminaria digitata* ja *Alaria crispa* kasvavat sublitoraalivyöhykkeen ylemmissä osissa, kun taas trooppisissa vesissä sublitoraalivyöhykkeen ylemmissä osissa esiintyvät punalevät.

Makrolevien vyöhykkeisyys vaihtelee kelpimetsien sukkesion mukaan. Makrolevien vyöhykkeisyyttä määrittää merisiilipopulaation koko, koska merisiilit käyttävät makroleviä ravinnokseen tai estävät niitä kiinnittymästä pinnoille (Duggins 1980). Suuri merisiilipopulaatio voi hävittää kokonaisen kelpimetsän alueelta. Alueelle voi kasvaa kuitenkin uusi monimuotoinen leväyhteisö, jos merisiilit häviävät alueelta. Alueella yläpuolisen leväkasvuston muodostavat *Nereocystis luetkeana* ja *Eualaria fistulosa*, ja alemman *Costaria costata* ja *Saccharina dentigera* ilman merisiilejä. Ajan myötä monivuotinen *Saccharina groenlandica* alkaa dominoida alueella, jolloin se nopeakasvuksena ottaa elinalueen haltuunsa, ja vie muilta leviltä elintilan (Duggins 1980).

2.2 Levien kemiallinen koostumus

Levien kemiallinen koostumus vaihtelee paljon lajien, elinympäristön ja ympäristötekijöiden mukaan (Taulukko 1) (Stengel ym. 2011). Levien kemialliseen koostumukseen vaikuttavat abioottiset tekijät, kuten lämpötila ja valo, sekä bioottiset tekijät kuten herbivorit.

Levät soveltuvat proteiininlähteeksi eläimille ja ihmisille korkean proteiinipitoisuutensa ja ravitsemuksellisesti hyödyllisen aminohappokoostumuksensa ansiosta (Berker 2007). Makrolevien proteiinipitoisuus vaihtelee vuodenajan mukaan (Fleurence 1999). Makrolevät sisältävät enemmän proteiinia talvella ja keväällä kuin kesällä.

Hiilihydraatit esiintyvät levissä tärkeilyksenä, ja muina polysakkarideina, sekä monosakkarideina, kuten glukoosina (Berker 2004; Spolaore ym. 2006). Levissä hiilihydraatteja esiintyy leväsolun soluseinässä, jossa hiilihydraattityyppi vaihtelee

leväryhmien mukaan. Esimerkiksi viherlevillä soluseinä koostuu selluloosasta, ruskolevillä sisäseinä koostuu selluloosasta ja ulkoseinä algiinista. Punalevillä soluseinä koostuu selluloosasta ja hyytelömäisistä polysakkarideista eli agaroosista ja agaropektiinistä. Viherlevillä varastohiilihydraatteja muodostetaan ja kerätään plastideihin. Punalevillä taas varastohiilihydraatteja muodostetaan soluseinän lisäksi solulimassa (Busi ym. 2013).

Mikro- ja makrolevien lipidimäärät vaihtelevat eri lajien välillä (Taulukko 1). Levien lipidi- ja rasvahappokoostumukseen vaikuttavat myös valo, lämpötila ja veden ravinnepitoisuus. Mikrolevien eli mikroskooppisten vesistöissä elävien yksisoluisten levien kuivapainoa kohden laskettu lipidimäärä on yleensä noin 20–50%, mutta se voi nousta jopa 80%:iin (Metting ym. 1996; Spolaore ym. 2006). Makrolevien lipidimäärän osuus kuivapainosta on pienempi kuin mikrolevillä (Maceiras ym. 2011; Pereira 2012). Levien lipidit sisältävät rasvahappoja, jotka voivat olla joko tyydyttyneitä tai tyydyttymättömiä (Christie & Han 2010).

Sisältämiensä pigmenttien ja vitamiinien ansiosta levät ovat mielenkiintoisia tuotteita kaupallisiin tarkoituksiin antioksidanttien ja muiden ravintolisien lähteenä. Kaikki yhteyttävät levät sisältävät klorofylli-a -pigmenttiä sekä apupigmenttejä, kuten karotenoideja ja ksantiineja (Spolaore ym. 2006).

Taulukko 1. Levälajien kemiallinen koostumus (% kuivapainosta). Muokattu artikkeleista Becker (2007) ja Pereira (2012).

Leväryhmät	Proteiinit	Hiilihydraatit	Lipidit
Cyanobacteria, Syanobakteerit			
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	62	23	2
<i>Spirulina plantensis</i>	46-63	8-14	4-9
<i>Synechococcus</i> sp.	63	15	11
Rhodophyta, Punalevät			
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14
<i>Palmaria palmata</i>	8-35	46-56	1-3
Chlorophyta, Viherlevät			
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Ulva compressa</i>	21-32	48	1-4
<i>Ulva lactuca</i>	10-25	36-43	1-2
Phaeophyceae, Ruskolevät			
<i>Fucus vesiculosus</i>	3-14	47	2
<i>Laminaria digitata</i>	8-15	48	1
Euglenozoa, Silmälevät			
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-18	14-20

2.3 Lipidit ja rasvahapot

Lipidit ovat monimuotoinen ryhmä eliöiden metabolian avulla tuotettuja rasvoja ja rasvamaisia yhdisteitä, joiden rakenteet ja toiminnallisuus vaihtelevat. Lipidit eivät liukene veteen, mutta ne liukenevat hyvin orgaanisiin liuottimiin kuten kloroformiin, bentseeniin, eettereihin ja alkoholeihin (Christie & Han 2010). Lipideille tyypillinen rakenne muodostuu vesiliukoisesta eli hydrofiilisesta päästä ja pitkäketjuisesta, hydrofobisesta hiilivetyketjusta.

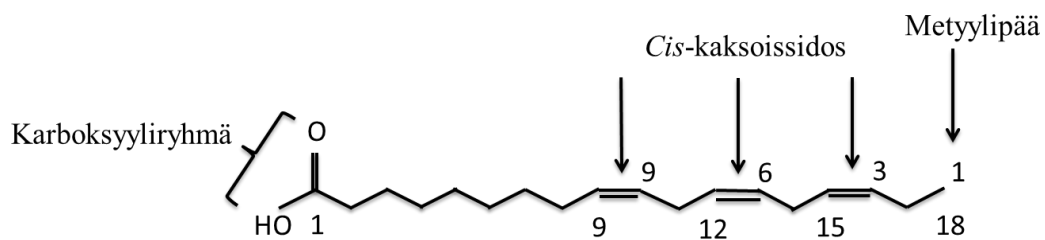
Lipidit voidaan jakaa varastolipideihin eli neutraaleihin lipideihin ja poolisiin eli kalvolipideihin, jotka jakautuvat edelleen fosfolipideihin ja glykolipideihin (Nelson & Cox 2008). Poolisilla kalvolipideillä on positiivisesti ja negatiivisesti varautuneet päät elektronitiheyden epätasaisen jakautumisen vuoksi. Varastolipidit toimivat energianvarastona eliöiden kudoksissa. Varastolipideihin kuuluvat triasyyliglyserolit (TAG) koostuvat yhdestä glyserolimolekyylistä ja siihen esteröityneistä kolmesta rasvahappoketjusta. Fosfolipidit ja glykolipidit ovat tärkeitä solukalvon ja muiden soluelinten kalvojen rakennusmateriaaleja. Fosfolipideissä glyserolimolekyylin kolmesta hiilestä kahteen on liittynyt esteröitynyt rasvahappo, ja kolmanteen fosforihappo. Glykolipideissä kolmanteen hiileen liittynyt yhdiste on hiilihydraatti.

Rasvahapot ovat lipidien rakenneosia, jotka koostuvat pitkistä, suorista hiilivetyketjuista, joissa on parillinen määrä hiiliatomeja. Ketjujen toisessa päässä on karboksyyliryhmä ja toisessa metyyliryhmä (Christie & Han 2010). Eliöt pystyvät muokkaamaan hiiliketjujen pituutta ja lisäämään niihin kaksoissidoksia. Yleensä rasvahapot ovat 2-36 hiilen pituisia, mutta mikrobien joukosta on löydetty jopa 80 hiilen pituisia rasvahappoja (Christie & Han 2010).

Rasvahapot eroavat rakenteellisesti toisistaan kaksoissidoksien määrän ja sijainnin perusteella. Rasvahapot ovat joko tyydyttyneitä (SFAs, saturated fatty acids), kertatyydyttymättömiä (MUFAs, monounsaturated fatty acids) tai monityydyttymättömiä (PUFAs, polyunsaturated fatty acids) (Christie & Han 2010). Tyydyttyneet rasvahapot sisältävät vain yksinkertaisia sidoksia hiiliatomien välillä. Tyydyttyneiden rasvahappojen hiiliketjut ovat suoria, jolloin vierekkäiset hiiliketjut pystyvät kasautumaan helposti yhteen. Tyydyttyneet rasvahapot ovat huoneenlämmössä kovia, ja niiden sulamispiste on korkea. Kertatyydyttymättömissä rasvahapoissa hiiliketjussa on yksi kaksoissidos ja monityydyttymättömissä rasvahapoissa kaksoissidoksia on vähintään kaksi. Kaksoissidoksellisissa rasvahapoissa voi esiintyä *cis-trans*-isomeriaa (Christie & Han

2010), jolloin saman yhdisteen eri rakennemuodoilla, eli isomeereillä, on usein toisistaan poikkeavat fysikaaliset ominaisuudet (Christie & Han 2010). Tyydyttymättömissä rasvahapoissa yleisemmin esiintyvä *cis*-kaksoissidos aiheuttaa hiiliketjuun mutkan, mikä estää vierekkäisiä rasvahappoketjuja pakkautumasta yhteen. *Trans*-kaksoissidos ei aiheuta hiiliketjuun mutkaa vaan ketju jää suoraksi. Tyydyttymättömien rasvahappojen muodostamat rasvat ovat tyydyttyneitä juoksevia, ja niiden sulamispiste on alhaisempi. Monityydyttymättömiä rasvahappoja ovat esimerkiksi omega-3 ja omega-6 rasvahapot (Christie & Han 2010).

Rasvahappoja nimetään niiden hiiliatomien lukumäärän, kaksoissidoksien lukumäärän ja ensimmäisen kaksoissidoksen sijainnin perusteella metyylipäästä laskien (Christie & Han 2010). Esimerkiksi alfa-linoleenihapon (ALA) lyhenne C18:3n3 kertoo, että rasvahapossa on 18 hiilen pituinen ketju, jossa on kolme *cis*-kaksoissidosta (Kuva 1). Monityydyttymättömissä rasvahapoissa vain lähimpänä metyylipäätä olevan kaksoissidoksen paikka ilmoitetaan, ja muut sijaitsevat yhden metyyliyhtymän takana kuten alfa-linoleenihapossa asemissa n-3, n-6 ja n-9.



Kuva 1. Alfa-linoleenihapon (ALA) rakenne, C18:3n3, jossa kolme *cis*-kaksoissidosta laskettuna metyylipäästä.

Levät pystyvät valmistamaan itse tarvitsemansa rasvahapot, mutta eläimet hankkivat välttämättömät rasvahapot myös ravinnon kautta. Näitä välttämättömiä rasvahappoja (EFA= essential fatty acid), kuten omega-3 ja omega-6 rasvahappoja, tuottavat alimman trofiatason eliöt, kasvit ja levät. Esimerkiksi merellisissä makrolevissä monityydyttymättömien rasvahappojen (PUFA) pitoisuus on suuri. Välttämättömiä rasvahappoja voidaan käyttää hyväksi myös biomarkkereina ravintoverkkojen tutkimisessa (Galloway ym. 2012).

2.4 Makrolevien lipidien ja rasvahappojen esiintyminen

Makrolevien sekovarren lipidit eroavat lajien välillä. Makrolevien sisältämä lipidimäärä ja -koostumus vaihtelevat vuodenaikojen ja eri ympäristömuuttujien, kuten valon, ravinteiden, suolaisuuden, lämpötilan ja raskasmetallien mukaan (Stengel ym. 2011). Tutkimuksessa on todettu, että makrolevien triasyyliglyserolien (TAG) tuotanto voimistuu voimakkaassa valossa (Hu ym. 2008). Alhainen valon intensiteetti suosii monityydyttymättömien rasvahappojen syntyä (Hu ym. 2008).

Makrolevien sekovarressa lipidejä on eniten talvella ja keväällä, kun taas lipidimäärä on matalin kesällä (Nelson ym. 2002). Gosch ym. (2012) tutkivat makroleväryhmien välisiä eroja lipidimäärän suhteen. Tutkimus osoitti, että makrolevistä ruskolevät sisälsivät eniten lipidejä (119,1 mg g⁻¹ kuivapainoa kohden). Viherlevät taas sisälsivät enemmän lipidejä kuin punalevät (Gosch ym. 2012; Kumar ym. 2010). Colombo ym. (2006) havaitsivat, että makrolevien rasvahappokoostumus ja -määrä vaihtelevat sekä alueellisesti että ajallisesti. Kylmien vesien (Kanada) levät sisälsivät enemmän monityydyttymättömiä rasvahappoja kuin lämpimien vesien levät (Kiina).

Sekä mikro- että makrolevät tuottavat enemmän lipidejä niukkaravinteisissa kuin ravinnekylläisissä olosuhteissa (Hu ym. 2008). Niukkaravinteisissa ja ankarissa oloissa makrolevät tuottavat enemmän lipidejä, jolloin perustuotanto pienenee (Griffiths ym. 2014).

Makroleväasukaa *Ulva* on tutkittu paljon sen ravitsemuksellisten ominaisuuksien kannalta. Floreton ym. (1993) suorittamassa kokeessa viherlevää *Ulva pertusa* kasvatettiin erilaisissa ympäristöoloissa, minkä jälkeen mitattiin kokonaislipidien määrä ja rasvahappojen koostumus. Kokeessa havaittiin, että *U. pertusa* -levän kokonaislipidimäärä nousi matalassa lämpötilassa ja korkeassa suolapitoisuudessa, kun tutkittiin lämpötilan ja suolapitoisuuden matalaa ja korkeaa tasoa. *U. pertusa* -viherlevän kasvunopeus oli korkeinta matalan lämpötilan, korkean valomäärän ja korkean suolapitoisuuden koeyksiköissä. Suolapitoisuuden vaihtelu havaittiin kasvua rajoittavaksi tekijäksi. Alhaisessa suolapitoisuudessa *U. pertusa* -levän lipidivarastot menevät kasvun ja osmoregulaation säätelyyn eivätkä solujen tuotantoon tai energiavarastoiksi. *U. pertusa* -levän kokonaislipidimäärää lisäsi matala veden lämpötila.

Toisessa tutkimuksessa Floreto ym. (1998) tutkivat, miten valomäärän voimakkuus ja suolapitoisuus vaikuttavat *Ulva pertusa*, *Grateloupia sparsa* ja *Sargassum piluliferum* -levien rasvahappokoostumukseen. Tulokset osoittivat, että korkea valomäärä ja alhainen

suolapitoisuus yhdessä vähensivät *U. pertusa* ja *S. piluliferum* -levien kokonaislipidimäärää. Korkea valomäärä lisäsi *U. pertusa* -levän tyydyttyneiden rasvahappojen määriä. Alhainen ja korkea suolapitoisuus kasvattivat taas *G. sparsa* -levän kokonaislipidimäärää. Tutkimuksessa saatiin myös selville, että *G. sparsa* ja *S. piluliferum* kestävät paremmin suolapitoisuuden vaihteluja kuin *U. pertusa*.

Makrolevien lipidimäärien on todettu muuttuvan lämpötilan muutoksien ja valon intensiteetin vaihtelujen mukaan. Goncharova ym. (2004) tutkivat, miten vuodenajan ja erityisesti lämpötilan muutokset vaikuttavat makrolevien lipidikoostumukseen. Tutkimuksessa havaittiin, että lipidiryhmistä neutraalilipidejä oli eniten kesällä melkein kaikissa tutkituissa levälajeissa. Triasyyliglyserolien osuus kaikista lipideistä oli 18–37%. Fosfolipidejä oli enemmän keväällä kuin kesällä. Makrolevien neutraalit lipidit ovat erityisen mielenkiinnon kohteena biodieselin raaka-aineeksi.

Khotimchenko & Yakovleva (2004) tutkivat, miten erilainen valon intensiteetti vaikuttaa viherlevän *Ulva fenestrata* lipideihin. Tutkimuksessa huomattiin, että varastolipidit, kuten triasyyliglyserolit, dominoivat silloin, kun *U. fenestrata* -viherlevää altistettiin fotosynteesistä aktiivisen säteilyn tasolle 80%:in PAR (58,7% kokonaislipideistä). Pooliset lipidit taas dominoivat 24%:in PAR altistuksessa. Valon erilainen voimakkuus muuttaa viherlevän lipidiryhmien suhteita. *U. fenestrata* pystyy muuttamaan lipidimetaboliaa vasteena erilaisesta valon voimakkuudesta.

Makrolevien rasvahappokoostumukseen vaikuttavat enemmän levien elinympäristön olosuhteet kuin taksonomia (Khotimchenko ym. 2002). Punalevillä, viherlevillä ja ruskolevillä on kaikilla omat rasvahappoprofiilinsa (Khotimchenko ym. 2002; Schmid ym. 2014). Arktisten alueiden makrolevät sisältävät enemmän monitydyttymättömiä rasvahappoja kuin lauhkeiden ja trooppisten alueiden makrolevät (Graeve ym. 2002).

Gosch ym. (2012) tarkastelivat tutkimuksessaan makrolevälajien rasvahappojen ja kokonaislipidien suhdetta. Tutkimuksessa havaittiin, että rasvahappojen määrä pienenee kun kokonaislipidimäärä nousee. Korkea kokonaislipidimäärä ei siis kerro korkeasta rasvahappomäärästä.

2.5 Mikrolevät

Monia mikrolevälajeja on tutkittu niiden lipidikoostumuksen ja lipidituottavuuden kannalta. Mikrolevälajien sisältämät lipidimäärät vaihtelevat eri lajien välillä (Taulukko 2).

Tutkituin mikrolevälaji *Chlorella vulgaris* sisältää 5-58% lipidejä sen kuivapainosta (Mata ym. 2010). *C. vulgaris* -viherlevän lipidituotanto on ollut 46 mg l⁻¹ d⁻¹ typpirajoittuneissa olosuhteissa (Stephenson ym. 2010). *C. vulgaris* tuottaa myös enemmän varastolipidi triasyyliglyseroleja korkeassa kadmium-altistuksessa ja alhaisessa fosforipitoisuudessa kuin alhaisessa kadmium-altistuksessa ja korkeassa fosforipitoisuudessa (Chia ym. 2013). *Chlorella* sp. -levän on ajateltu soveltuvan hyvin kaupalliseen lipidituotantoon, sillä sitä on helppo kasvattaa ja se on nopeakasvuinen (Lv ym. 2010).

Taulukko 2. Merellisten ja makeanveden mikrolevälajien lipidimäärä ja -tuotanto. Muokattu artikkelista Mata ym. (2010).

Mikroleväryhmät	Lipidimäärä (% kuivapainosta)	Lipidituotanto (mg l ⁻¹ d ⁻¹)	Perustuotanto (g l ⁻¹ d ⁻¹)	Alueellinen perustuotanto (g m ⁻² d ⁻¹)
Cyanobacteria, Syanobakteerit				
<i>Spirulina maxima</i>	4-9	-	0,21-0,25	25
Chlorophyta, Viherlevät				
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75	-	0,02	3
<i>Chlorella vulgaris</i>	5-58	11,2-40	0,02-0,2	0,57-0,95
<i>Chlorella</i> sp.	10-48	42,1	0,02-2,5	1,61-16,47
<i>Dunaliella salina</i>	6-25	116	0,22-0,34	1,6-3,5
<i>Nannochloris</i> sp.	20-56	60,9-76,5	0,17-0,51	-
<i>Scenedesmus</i> sp.	19,6-21	40,8-53,9	0,03-0,26	2,43-13,52
<i>Tetraselmis suecica</i>	8,5-23	27-36,4	0,12-0,32	19
<i>Tetraselmis</i> sp.	12,6-14,7	43,4	0,3	-
Haptophyta, Tarttumalevät				
<i>Isochrysis</i> sp.	7,1-33	37,8	0,08-0,17	-
<i>Pavlova salina</i>	31	49,4	0,16	-
Eustigmatophyceae				
<i>Nannochloropsis</i> sp.	12-53	37,6-90	0,17-1,43	1,9-5,3

Liang ym. (2009) tutkivat *C. vulgaris* -viherlevän biomassan ja lipidien tuotantoa eri kasvuolosuhteissa. *C. vulgaris* -viherlevällä oli korkeimmat solunsisäiset lipidimäärät (38%), kun levän annettiin kasvaa autotrofisesti yhteyttämällä. *C. vulgaris* -levällä oli taas korkein lipidituotanto (54 mg l⁻¹ d⁻¹), kun levä kasvoi heterotrofisesti eli hiilen lähteenä oli glukoosi. *C. vulgaris* on siis mikсотrofi eli se pystyy vaihtamaan energian- ja hiilenlähdettä.

C. vulgaris -viherlevän mikсотrofista kasvua ja lipidien tuotantoa on tutkittu käyttämällä jätevesiä kasvatusvetenä. Cabanelas ym. (2013) havaitsivat, että *C. vulgaris* -levän biomassan tuotanto oli 118 mg l⁻¹ d⁻¹ ja lipidituotanto oli 18 mg l⁻¹ d⁻¹ mikсотrofisissa olosuhteissa, jossa kasvatusvetenä toimi jätevesi ja hiilenlähteenä oli 50 mM glyseroli.

Myös Feng ym. (2011) tutkivat *C. vulgaris* -levän lipidituotantoa jätevesissä ja mittasivat kasvatuksen korkeimmaksi lipidimääräksi 42% kuivapainosta ja lipidien tuotanto oli 147 mg l⁻¹ d⁻¹. *C. vulgaris* poisti myös tehokkaasti ravinteita jätevedestä.

Mikrolevälajit sopeutuvat ympäristötekijöiden aiheuttamiin muutoksiin nopeammin kuin makrolevälajit. Mikrolevät reagoivat makroleviä nopeammin ravinnepuutokseen, jolloin mikrolevien kemiallinen koostumus muuttuu. Ravinnepuutostilassa mikrolevät tuottavat enemmän lipidejä kuin kasvattaisivat perustuotantoa (Hu ym. 2008; Rodolfi ym. 2008). Mikrolevälajin *Nannochloropsis* sp. lipidituotantoa on tutkittu ravinnepuutosolosuhteissa (Rodolfi ym. 2008). *Nannochloropsis* sp. -levän lipidimäärä kasvoi typpirajoitteisissa oloissa 32%:sta 60%:iin. Samoin mikrolevän lipidituotanto parani 117 mg l⁻¹ d⁻¹ 204 mg l⁻¹ d⁻¹. Myös lämpötilan on huomattu vaikuttavan levien kokonaislipidimäärään. Esimerkiksi *Nannochloropsis salina* -levän kokonaislipidimäärät kasvoivat, kun veden lämpötila nousi (Hu ym. 2008), mutta samanlaista muutosta ei havaittu, kun *Chlorella sorokiniana* -levää kasvatettiin eri lämpötiloissa. Converti ym. (2009) havaitsivat, että lämpötilan nousu kaksinkertaisti *Nannochloropsis oculata* -levän lipidimäärän, mutta vähensi *Chlorella vulgaris* -levän lipidimäärää. Typpipitoisuuden vähentäminen kasvuvedessä kasvatti molempien mikrolevien lipidimäärää.

Solovchenko ym. (2008) tutkivat, miten valon intensiteetin voimakkuus ja typen puutos vaikuttavat mikrolevän *Parientochloris incisa* kasvunopeuteen ja rasvahappokoostumukseen. Mikrolevällä oli korkein kasvunopeus suurimmassa valon voimakkuudessa (PAR-säteilyä 400 μmol m⁻² s⁻¹) runsastyypisessä viljelmässä verrattuna alhaiseen valon voimakkuuteen. Korkeimmassa valon voimakkuudessa mikrolevä sisälsi myös eniten rasvahappoja nopean perustuotannon lisääntymisen takia.

2.6 Makrolevien hyötykäyttöä

Mikro- ja makroleviä on kauan käytetty hyväksi esimerkiksi ihmisravintona, kalan ruokana sekä kosmetiikka- ja elintarviketeollisuudessa. Leväjalosteet ovat yleensä tabletin, pulverin, kapselin tai nesteen muodossa (Kovač ym. 2013; Spolaore ym. 2006). Levätuotteet tarkistetaan ennen markkinoille laskemista, etteivät ne sisällä myrkyllisiä aineita, kuten nukleiinihappoja tai raskasmetalleja (Kovač ym. 2013; Spolaore ym. 2006).

Leviä käytetään ravinnoksi rannikkoalueilla. Erityisesti *Porphyra* sp. (Nori), *Chondrus crispus*, *Himanthalia elongata* ja *Undaria pinnatifida* -leviä kerätään runsaasti ravinnoksi

(Abdallah 2012). Makroleviä käytetään ravinnoksi niiden alhaisen kalorimäärän sekä korkeiden proteiini-, hivenaine- ja vitamiinipitoisuuksien vuoksi (Mohamed ym. 2012). Levät ovat myös hyviä omega-3- ja omega-6-monityydyttymättömien rasvahappojen lähteitä, koska ihmiset eivät pysty itse valmistamaan kyseisiä rasvahappoja vaan niitä hankitaan ravinnon kautta (van Ginneken ym. 2011). Makrolevien rasvahappoja voidaan käyttää tulehdus- sekä sydän- ja verisuonitautien hoidossa alhaisen omega-6/omega-3 suhteensa takia (Abdallah 2012). Makrolevät voisivat olla hyvä omega-3- ja omega-6-rasvahappojen lähde kalaöljyn sijaan.

Leviä käytetään eläinten ruokintaan vesiviljelystä maatalaeläimiin (Kovač ym. 2013). Leviä käytetään eniten nilviäisten, katkarapujen ja kalojen ravintona, koska levät ovat ryhmien luonnollista ravintoa. Lohet saavat tyypillisen oranssin värin lihaansa levien sisältämien karotenoidi -pigmenttien avulla.

Kaupallisesti käytettyjä polysakkarideja, kuten agaria ja algiinia saadaan makrolevistä. Punalevien soluseinän päällimmäistä kerrosta eli agaria käytetään ruoka-, kosmetiikka- ja laboratorioteknologiaan. Ruskolevien soluseinän algiinia käytetään elintarvikkeiden, lääkkeiden ja kosmetiikan stabilointiaineena (Kovač ym. 2013). Levien sisältämiä polysakkarideja voisi mahdollisesti käyttää hyväksi syövän ja virusperäisten sairauksien hoidossa (Stengel ym. 2011).

Makroleviä käytetään myös rannikkoalueiden viljelymaiden lannoitteena (Abdallah 2012). Esimerkiksi Filippiineillä *Sargassum* -suvun makrolevää käytetään peltojen lannoitteena. Makroleviä kasvatetaan kalankasvatusaltaiden tai jätevedenpuhdistamoiden läheisyydessä, koska makrolevät pystyvät sitomaan kalankasvatusaltaiden vapauttavia ylimääräisiä ravinteita itseensä. Makroleviä on alettu myös käyttää raskasmetallien indikaattoreina. Raskasmetallit kerääntyvät makrolevistä erityisesti ruskoleviin (Abdallah 2012). Biologisina indikaattoreina raskasmetallisaastumisesta on käytetty *Sargassum* sp., *Laminaria* sp. ja *Ecklonia* sp.-ruskoleviä sekä *Ulva* sp. -viherlevää (Abdallah 2012).

2.6.1 Biopolttoaineet

Nykypäivänä kiinnostus energiantuotantoon on siirtynyt kohti uusiutuvia energialähteitä kuten biopolttoaineita, koska fossiilisten polttoaineiden raaka-aineet ovat vähenemässä. Kansainväliset sopimukset biopolttoaineiden käytön lisäämisestä ovat saaneet monet maat investoimaan biopolttoaineiden, kuten bioetanolin ja biodieselin tuotantoon. Biopolttoaineiden käyttö on fossiilisia polttoaineita ympäristöystävällisempää, koska

kasvihuonekaasujen päästöt ovat neutraaleja eli syntyneet kasvihuonekaasut sitoutuvat kasvillisuuteen. Biopolttoaineet voidaan jakaa ensimmäisen, toisen ja kolmannen sukupolven biopolttoaineisiin (Nigam & Singh 2011). Jaottelu perustuu polttoaineiden valmistuksessa käytettäviin raaka-aineisiin ja niiden alkuperään.

Ensimmäisen sukupolven biopolttoaineen raaka-aineena käytetään elintarviketuotantoon soveltuvia kasveja, kuten sokeriruokoa ja maissia (Nigam & Singh 2011). Toisen sukupolven biopolttoaineiden raaka-aineena käytetään prosessoitua kasviperäistä jätettä, ruuantuotannon jättemateriaalia, jossa on korkea lignoselluloosapitoisuus. Kolmannen sukupolven biopolttoaineiden raaka-aineena on käytetty mikro- ja makrolevien levämassaa.

Bioetanolia tuotetaan esimerkiksi sokerijuurikkaasta, sokeriruo'osta ja maissista. Kasviperäisten materiaalien sokereista tuotetaan ensimmäisen sukupolven bioetanolia käymisprosessissa. Toisen sukupolven bioetanolia tuotetaan entsyymaattisessa hydrolyysissä lignoselluloosasta, eli kasvien selluloosasta, hemiselluloosasta ja ligniinistä koostuvasta biomassasta (Nigam & Singh 2011). Kolmannen sukupolven bioetanolia on tuotettu mikrolevien ja mikrobien biomassan hiilihydraateista. USA ja Brasilia ovat suurimpia bioetanolin tuottajia (Renewable fuels association 2014).

Biodieseliä puolestaan tuotetaan palmuöljystä ja rapsista kasvisrasvojen transesteröinnillä (Nigam & Singh 2011). Biodieselin tuotannon raaka-aineesta riippuu onko se ensimmäisen vai toisen sukupolven biodieseliä. Kolmannen sukupolven biodieselin tuotannossa avaintekijöitä ovat levien lipidimäärän ja biomassan tuotannon optimoiminen sekä mikro- että makrolevillä (Nigam & Singh 2011).

Mikro- ja makrolevät olisivat hyvä vaihtoehto biopolttoaineiden raaka-aineena, koska niitä on helppo kasvattaa, eivätkä ne kilpaile ihmisravinnon kanssa peltoalasta (Taulukko 3) (Dragone ym. 2010; Nigam & Singh 2011). Esimerkiksi vuositasolla mikrolevistä tuotetun biodieselin määrä voisi olla suurempi kuin nykyisin käytössä oleva palmuöljystä tai maissista tuotettu biodieselin määrä (Taulukko 3). Mikrolevät tuottavat 20–50% kuivapainostaan lipidejä ja ne kasvavat nopeasti (Chisti 2007; Nigam & Singh 2011). Mikro- ja makroleviä pystyisi kasvattamaan erilaisissa kasvuolosuhteissa kuten jätevedessä, josta levät käyttäisivät hyödykseen ravinteet (Dragone ym. 2010). Levät pystyisivät sitomaan myös paljon hiilidioksidia. Levistä on mahdollista saada monipuolisesti erilaisia biopolttoainetuotteita, kuten biodieseliä, bioetanolia ja biokaasua (Dragone ym. 2010; Suutari ym. 2015).

Taulukko 3. Mikrolevien potentiaalinen öljymäärä verrattuna yleisiin biodieselin raaka-aineisiin. Muokattu artikkelista Mata ym. (2010).

Raaka-aine	Siemenen öljymäärä (öljyn paino, % biomassasta)	Öljyn saanti (l öljyä/ha vuosi ⁻¹)	Maankäyttö (m ² vuosi/kg biodiesel)	Biodieselin tuotanto (kg biodiesel/ha vuosi)
Maissi (<i>Zea mays</i>)	44	172	66	152
Soijapapu (<i>Glycine max</i>)	18	636	18	562
Auringonkukka (<i>Helianthus annuus</i>)	40	1070	11	946
Öljypalmu (<i>Elaeis guineensis</i>)	36	5366	2	4747
Mikrolevä (pieni öljymäärä)	30	58 700	0,2	51 927
Mikrolevä (kohtalainen öljymäärä)	50	97 800	0,1	86 515
Mikrolevä (korkea öljymäärä)	70	136 900	0,1	121 104

Niukkaravinteisten olosuhteiden vaikutusta lipideihin on tutkittu melko paljon mikrolevilla, mutta makrolevien osalta tuloksia on rajoitetusti. Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää pystyykö Itämeren makrolevistä tuottamaan biopolttoaineita, erityisesti biodieseliä. Tutkimuksessa selvitettiin, miten veden ravinnepitoisuus (fosfori ja typpi) vaikuttaa makrolevien sekovarren lipidimäärään ja rasvahappokoostumukseen. Tutkimuksessa selvitettiin myös *U. intestinalis* -viherlevän lipidimäärän vuodenaikaisvaihtelua. Oletuksena oli, että makrolevät tuottavat eniten lipidejä niukkaravinteisissa käsittelyissä kuten kontrolli- sekä vain typpilisäys- ja fosforilisäyskäsittelyissä.

3. Aineisto ja menetelmät

3.1 Koejärjestely

Tutkimuksen ensimmäinen akvaariokoe tehtiin 12.8.–22.8.2013 Tvärminnen eläintieteellisellä asemalla. Kokeeseen käytetyt makrolevät kerättiin tutkimusaseman läheisyydestä 12.8.2013. *U. intestinalis* -levää löytyi merestä tutkimusaseman laboratoriorakennuksen edestä (N59.844147, E23.249431), kun taas *C. glomerata* -yksilöt haettiin Joskär-saaren (N59.845505, E23.256083) rannalta. Molemmat viherlevät kerättiin 0–0,1 m syvyydestä kalliopohjalta.

Tutkimuksen toinen kenttäosuus tapahtui 30.9.–1.10.2013. Viherlevä *U. intestinalis* haettiin Halsholmen-saaren (N59.842476, E23.256662) eteläpuolelta, kun taas punalevä *Ceramium tenuicorne* kerättiin Joskär-saarelta 0–0,1 m syvyydestä kalliopohjalta ja kivien pinnalta.

Laboratoriossa makrolevät huuhdeltiin merivedellä levien seassa olevien eläinten ja epifyyttisten levien poistamiseksi. Tämän jälkeen levien märkäpaino punnittiin Mettler Toledo UMX/MX/AX vaa'alla. Elokuun kokeessa *U. intestinalis* -viherlevää punnittiin märkäpainona n. 5 g kahdeksaan koeyksikköön, ja *C. glomerata* -viherlevää samoin n. 5 g omiin kahdeksaan koeyksikköönsä. *U. intestinalis* ja *C. glomerata* -viherlevät asetettiin painoineen kasvatuskoreihin, joiden ympärille sidottiin läpinäkyvä verkko. Kasvatuskorit asetettiin altaiden pohjalle. Lokakuun kokeessa sekä *U. intestinalis* -viherlevää että *C. tenuicorne* -punalevää punnittiin samoin n. 5 g omiin koeyksikköihinsä.

Makrolevät asetettiin 30 l altaisiin, joiden vesi valmistettiin ionivaihdetusta vedestä ja merisuolasta (Tropic Marine) niin, että altaiden suolapitoisuudeksi saatiin 5,8. Jokaisessa altaassa oli pumppu, joka kierrätti altaan vettä ja piti näin huolen veden sekoittumisesta. Koeyksiköiden käsittelyiden sijainti tutkimustilassa arvottiin sattumanvaraisesti (koejärjestely liitteenä). Molemmilla koekerroilla makrolevät laitettiin altaisiin kokeen toisena päivänä ilman ravinnelisäystä, tosin maanantaina 12.8.2013 ja maanantaina 30.9.2013 ravinnelisäykset tehtiin koealtaisiin ilman makroleviä.

Kokeet kestivät 10 päivää 12.–22.8.2013 ja 30.9.–10.10.2013. Joka toinen päivä kaikista altaista otettiin ravinnenäytteet happopestyihin näytepulloihin, minkä jälkeen tehtiin ravinnelisäykset ja altaiden vesi sekoitettiin kunnolla. Tämän jälkeen otettiin kaikista altaista ravinnelisäyksen jälkeiset ravinnenäytteet. Kokeen jokaisena päivänä tehtiin

ravinnelisäykset koealtaisiin, paitsi kokeen toisena päivänä. Joka toinen päivä mitattiin myös koealtaiden veden lämpötila. Elokuun kokeen aikana viherlevillä oli 18 h valo- ja 6 h pimeärytmi. Lokakuun kokeessa valorytmi oli 16 h valoa ja 8 h pimeää. Akvaariokokeen valaistuksen loisteputket olivat Philips TLD58W/965 ja Philips TL-D 90 De Luxe Pro 58W/965. Koealtaiden valon intensiteetti mitattiin LI-COR Datalogger valomittarilla (model LI-1000 sr. no. LDL 978). Elokuussa valon intensiteetti oli $54 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ja lokakuussa $54,8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Altaisiin lisättiin ionivaihdettua vettä ja merisuolaa korvaamaan haihtumista. Aloitustilanteen lipidimäärityksiä varten pakastettiin elokuussa märkäpainoltaan yli 10 g sekä *U. intestinalis* että *C. glomerata* -leviä. Lokakuussa pakastettiin samoin *U. intestinalis* ja *C. tenuicorne* -leviä myöhemmin suoritettavaa aloitushetken lipidimäärän määrittystä varten.

Ravinnelisäykset oli suunniteltu siten, että ne olisivat kaksi kertaa suurempia kuin mitä veden ravinnepitoisuus on luonnossa. Natriumnitraatista (NaNO_3 , pitoisuus $12\,743 \text{ mg l}^{-1}$) ja kaliumdivetyfosfaatista (KH_2PO_4 , pitoisuus $1\,318 \text{ mg l}^{-1}$) valmistettiin 100x laimennokset, eli happopestyihin pulloihin pipetoitiin 1 ml ravinneliuosta ja 99 ml Milli-Q vettä (NaNO_3 100x laimennoksen pitoisuus: $127,43 \text{ mg l}^{-1}$; KH_2PO_4 100x laimennoksen pitoisuus: $13,18 \text{ mg l}^{-1}$).

Sekä elo- että lokakuun kokeissa kaikkiin 16 koealtaaseen lisättiin perustasona NaNO_3 :n 100x laimennosliuosta siten, että NaNO_3 :n 100x laimennosliuoksen pitoisuus koealtaissa oli $9,1 \mu\text{g l}^{-1}$ ja KH_2PO_4 :n 100x laimennosliuoksen pitoisuus oli $2,2 \mu\text{g l}^{-1}$ jokaisella ravinteidenlisäyskerralla. Kontrollikäsittelyissä (C) tämä oli ainoa lisäystaso. Varsinaisiin ravinnelisäyskäsittelyihin annosteltiin perustason lisäksi vielä lisää joko typpeä, fosforia tai molempia. Typpilisäyskäsittelyihin (N) ja typpi- ja fosforilisäyskäsittelyihin (N+P) lisättiin perustason lisäksi natriumnitraattia $12\,743 \text{ mg l}^{-1}$ pitoisuudesta niin, että sen lopullinen pitoisuus koealtaissa oli $485,5 \mu\text{g l}^{-1}$. Fosforilisäyskäsittelyihin (P) ja käsittelyyn N+P lisättiin perustason lisäksi kaliumdivetyfosfaattia $1\,318 \text{ mg l}^{-1}$ pitoisuudesta siten, että sen lopullinen pitoisuus koealtaissa oli $87,9 \mu\text{g l}^{-1}$. Ravinnelisäykset tehtiin käyttäen pipettejä Thermo Scientific Finnpiette® 5 ml ja Finnpiette® F2 20–200 μl (Thermo Fisher Scientific Oy).

Kokeiden viimeisinä päivinä, 22.8.2013 ja 30.9.2013, levät otettiin pois altaista ja huuhdeltiin ionivaihdetulla vedellä. Makrolevien märkäpaino punnittiin uudelleen ja levät siirrettiin -80°C syväpakastimeen (Thermo Scientific syväjäähäkaappi).

Akvaariokokeen altaiden ravinnemääritykset tilattiin Tvärminnen eläintieteellisen aseman laboratoriosta. Valmiit ravinneliuokset valmistettiin kiinteistä suoloista (NaNO_3 $M=84,99$ g/mol; KH_2PO_4 $M=136,09$ g/mol). Ravinnenäytteistä nitraatti ja fosfaatti mitattiin Thermo Scientific Aquakem 250 -fotometrillä. Ammoniakki ja nitriitti mitattiin Hitachi U-1100 -spektrofotometrillä.

3.2 Makrolevien esikäsittely

Akvaariokokeen makrolevät kuivattiin pakastekuivurissa (Thermo Savant ModulyoD alipainekylmäkuivaaja) 0,3 l:n happopestyissä pakasterasioissa. Leviä pakastekuivattiin noin kolme vuorokautta -50°C lämpötilassa ja alle 1 mbar paineessa. Pakastekuivauksen jälkeen makrolevien kuivapaino punnittiin Precisa 303 A vaa'alla, ja näytteet siirrettiin syväpakastimeen (-70°C). Levänäytteet jauhettiin sen jälkeen morttelissa hienojakoiseksi jauheeksi, ja siirrettiin happopestyihin lasisiin tuikepulloihin, joihin lisättiin kaasumaista typpeä. Levänäytteet säilytettiin syväpakastimessa, jotta näytteiden lipidit eivät pääsisi muuttumaan.

3.3 Lipidien eristys

Makrolevänäytteistä lipidimäärät määritettiin 8 ravinnekäsittelystä näytteestä, sekä leväkasvatuksen alkutilanteesta. Jauhettua makrolevänäytettä punnittiin koeputkiin noin 50 mg (Kimax, 13 ml), ja koeputket suljettiin typpikaasuvirran alla, ettei happi turmelisi makrolevien lipidejä. Samalla punnittiin lipidien eristyksessä käytettävien koeputkien (Kimax, 15 ml) painot gravimetrista punnitusta varten. Koeputkissa oli teflonkorkit. Jokaisella eristyskerralla mukana oli myös nollanäyte, jonka avulla mahdollinen liuoksien tai työtavasta johtuva kontaminaatio olisi havaittu. Lipidien eristykset suoritettiin Lahdessa Helsingin yliopiston ympäristötieteiden laitoksella AlmaLabin laboratoriotiloissa. Lipidien eristys tehtiin Christie & Han (2010) ohjeiden mukaisesti.

Lipidieristykset aloitettiin lisäämällä jauhettua levänäytteen sisältäviin koeputkiin 1 ml isopropanolia, jonka avulla saatiin inaktivoitua lipidejä hajottavat entsyymit. Koeputket suljettiin typpikaasuvirran alla, sekoitettiin vortex-ravistelijalla 1 min ja sentrifugoitiin 4 min (3000 rpm, 4°C). Sentrifugointi tehtiin 4°C :ssa lipidejä muuttavien kemiallisten reaktioiden minimoimiseksi. Koeputkista pipetoitiin sentrifugoinnin jälkeen lasipipetillä päällimmäinen nestefaasi toisiin koeputkiin (15 ml), jos se oli mahdollista. Monissa

näytteissä päällimmäisessä nestefaasissa oli myös levähiukkasia, jolloin nestettä ei siirretty toisiin koeputkiin. Koeputkiin lisättiin isopropanolia lasipipettien huuhtelun yhteydessä ja koeputket laitettiin typpikaasuvirran alle haihtumaan lämpöhauteeseen (35 °C).

Alkuperäisiin, levänäytteet sisältäviin koeputkiin lisättiin Dispensette® annostelijalla 8 ml jääkylmää kloroformi-metanolia (2:1 -vol/vol), 1 ml puhdasta vettä (Millipore), sekä 20 µl butyloitua hydroksitolueenia (BHT) (1% liuos metanolissa). Koeputket suljettiin typpikaasuvirran alla ja laitettiin ultraäänisonikaattoriin jääkylmään veteen 10 minuutiksi, sitten sekoitettiin vortex-ravistelijalla (1 min) ja sentrifugointiin (4 min, 3000 rpm, 4 °C). Ultraäänisonikaatiossa levänäytteen solut saadaan rikottua, jolloin lipidit vapautuvat soluista.

Sentrifugoinnin jälkeen koeputkista siirrettiin alin, nestemäinen kerros kaksoispipetoimalla toisiin koeputkiin (15 ml). Lyhyempi Pasteur -pipetti asetettiin varovasti koeputken pohjalle leväkerroksen läpi ja pidempi Pasteur -pipetti asetettiin lyhyemmän pipetin sisään, jolloin alimmainen nestefaasi voitiin pipetoida pois koeputkista ilman, että levää siirtyi 15 ml:n koeputkiin. Levänäytteet sisältäviin koeputkiin lisättiin jääkylmää kloroformia ja ne suljettiin typpikaasuvirran alla. 15 ml:n koeputket laitettiin typpikaasuvirran alle haihtumaan.

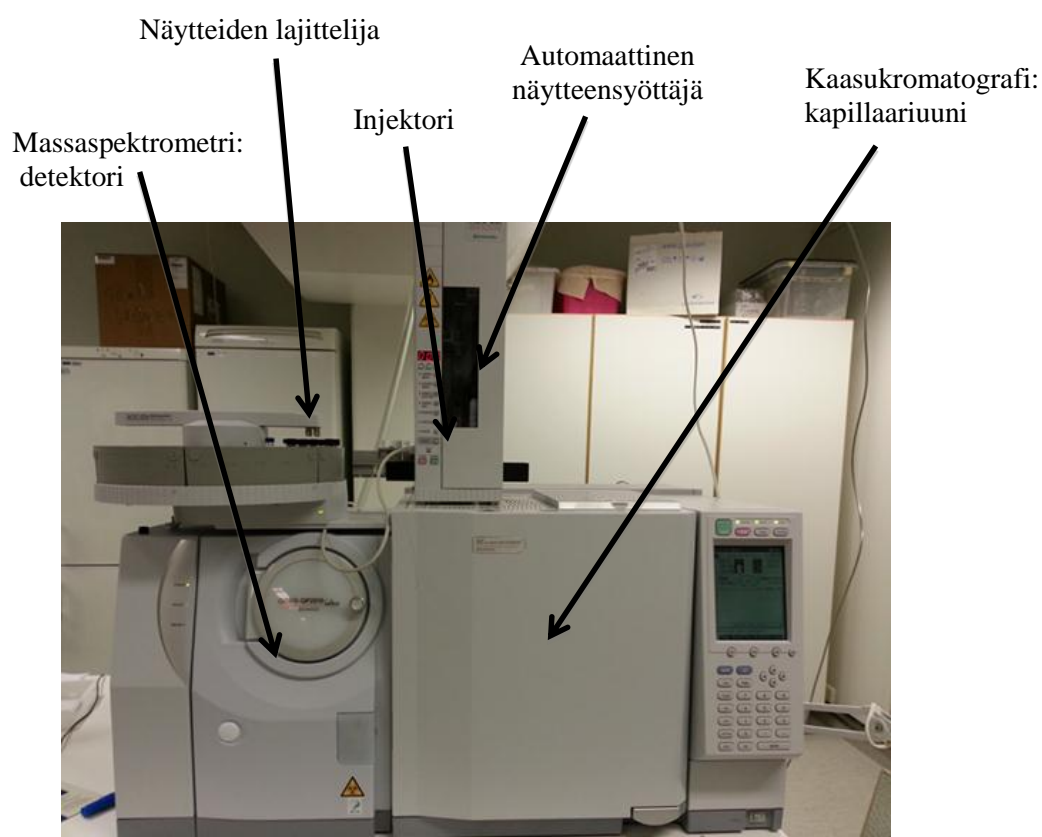
Levänäytteet ultraäänisonikoitiin, sekoitettiin vortex-ravistelijalla ja sentrifugoitiin kuten edellä ja alimmainen kerros pipetoitiin kaksoispipetillä 15 ml:n koeputkiin vielä kaksi kertaa ennen kuin levänäytteiden koeputkien alimmainen kerros oli kirkasta, eli kaikki näytteen lipidit oli eristetty ja siirretty 15 ml:n koeputkiin. 15 ml:n koeputket haihdutettiin kuiviksi typpikaasuvirran alla, minkä jälkeen putket punnittiin. Näin saatiin lipidien kokonaismäärä määritettyä gravimetrisesti, eli painon perusteella. Punnituksen jälkeen 15 ml:n koeputkiin lisättiin seinämiä pitkin hieman heksaania näytteen säilömiseksi. 15 ml:n koeputket suljettiin typpikaasuvirran alla ja säilöttiin -20 °C.

3.4 Kaasukromatografi-massaspektrometri

Kaasukromatografia perustuu näytteen komponenttien jakautumiseen liikkuvan kaasufaasin ja kiinteään kantajaan sidotun paikallaan pysyvän nestefaasin välillä. Liikkuvana kaasufaasina tai kantokaasuna käytetään yleensä heliumia tai vetyä. Kaasukromatografissa näytteen rasvahapot liikkuvat eri nopeuksilla riippuen hiiliketjun pituudesta. Yhdisteet kulkevat kolumnissa kiehumispistejärjestyksessä. Rasvahappojen

hiiliketjun kasvaessa sen kiehumispiste nousee. Lyhyemmät hiiliketjut kulkevat nopeasti kolumnin läpi, mutta pidemmät hiiliketjut viettävät enemmän aikaa kolumnissa suuremman kokonsa takia. Kaasukromatografissa näyte muuttuu kaasumaiseksi. Kaasukromatografian osina ovat näytteensyöttäjä eli injektori, kapillaariuuni sekä detektori eli tiedonkeruuyksikkö (Kuva 2) (Christie & Han 2010).

Kaasukromatografian detektorina käytettiin massaspektrometria. Massaspektrometria on erotustekniikka, jossa sähköisin tai kemiallisin menetelmin ionisoidaan yhdisteitä, sekä käytetään sähkö- ja magneettikenttien tuottamia voimia varattujen molekyylien erottamiseen niiden massa/varaus -suhteen (m/z) mukaan (Jaarinen & Niiranen 2005).



Kuva 2. Kaasukromatografi-massaspektrometrilaitteiston rakenne.

3.4.1 Näytteiden analysointi kaasukromatografi-massaspektrometrillä

Makrolevien lipidit analysoitiin kaasukromatografi-massaspektrometrillä (GCMS-QP2010 Series, Shimadzu), jossa oli kapillaarikolumni (Agilent J&W GC columns DB-23, 0.25 mm x 30 m x 0.15 μ m, Agilent Technologies, catalogue no. 122-2331). Automatisoitu näytteensyöttölaitteisto (Autoinjektori AOC-20; Autosampleri AOC-20i+s, Shimadzu)

injektoidi nestemäisen näytteen kaasukromatografiin (split ratio 10:1) ja kantokaasuna käytettiin heliumia (kokonaisvirtausnopeus 12,3 ml/min, kolonnin virtaus 0,84 ml/min). Injektorin ja massaspektrometrin lämpötilat olivat 250 °C. Näytteen analysoinnin alussa kolonnin lämpötila pysyi 60 °C:ssa, mutta kolonnin lämpötila nousi asteittain noin 23 minuutin kuluessa 250 °C:een, jossa kolonnin lämpötila pysyi 25 minuuttia. Yhden näytteen analysointiin meni keskimäärin 53 minuuttia.

Tunnistimme näytteen rasvahapot GCMS -solution Ver.2.6 ohjelmaan asetettujen retentioaikojen ja referenssi-ionien avulla. Näytteiden rasvahappoja verrattiin FAME 37 eli rasvahappometyyliesterin 37 -standardiin (Larodan Fine Chemicals FAME 37 mix, catalogue no. 0 302:10, 10 mg/ml, 99 %), jossa on tunnettu määrä 37 rasvahappoa (FAME 37 sekoituksen koostumus liitteenä). FAME 37 -sekoituksen standardista valmistettiin laimennossarja, jonka avulla saatiin standardisuora. Näytteiden lipidien rasvahapot kvantifioitiin näytteisiin lisättävän sisäisen standardin C18:0-D3 (99 %, catalog no. 71-1803-8, Larodan Fine Chemicals, Sweden) avulla. Sisäinen standardi oli deuteroitu eli hiiliketjun kolme vetyä oli korvattu deuteriumilla. Analyysissä FAME 37 -sekoitus laimennettiin 2,5; 25, 100 ja 250 ng/μl pitoisuudeksi.

3.5 Kokonaisrasvahappojen metylaatio

Eristetyistä lipidinäytteistä tehtiin kokonaisrasvahappojen metylointi Christie & Han (2010) kirjassa esitetyn ohjeen mukaan. Metyloinnissa lipidien rasvahapoista valmistettiin hapon katalysoimana rasvahappojen metyyliestereitä. Näytteiden rasvahappojen metyyliesterit analysoitiin kaasukromatografian avulla. Oliiviöljyä (4 μg/μl) käytettiin vertailunäytteenä tarkasteltaessa metyloinnin onnistumista. Heksaaniin säilötyt lipidinäytteet laitettiin typpikaasuvirran alle haihtumaan, ja haihtumisen jälkeen näytekoeputkiin pipetoitiin tunnettu (2 ml) määrä heksaania, jotta näytteistä saatiin pipetoitua 500 μl:n osanäyte metylointia varten. Alkuperäinen näyteputki täytettiin typpellä ja säilöttiin pakastimessa (-20 °C) fraktiointia varten. Metyloitavan näytteen sisältävät koeputket haihdutettiin typpikaasuvirran alla kuivaksi. Oliiviöljyä (4 μg/μl) pipetoitiin 500 μl erilliseen koeputkeen, joka myös haihdutettiin kuivaksi typpikaasuvirran alla. Jatkossa oliiviöljynäytteelle tehtiin kaikki samat käsittelyt kuin varsinaisille näytteillekin.

Koeputkiin lisättiin 1 ml tolueenia, 20 μl butyloitua hydroksitolueenia (BHT) (1% liuos metanolissa), sekä sisäistä standardia C18:0-D3 siten, että näytteen sisäisen standardin pitoisuus ajoon laitettaessa oli noin 3 ng/μl. *U. intestinalis* ja *C. tenuicorne* -lipidinäytteisiin

lisättiin 100 µl C18:0-D3 320 ng/µl pitoisuudesta. *C. glomerata* -lipidinäytteisiin lisättiin 50 µl C18:0-D3 3010 ng/µl pitoisuudesta. Koeputkiin lisättiin 2 ml metylointireagenssia (1% rikkihappo:metanoli -liuosta). Koeputket suljettiin typpikaasuvirran alla, ja sekoitettiin 30 s vortex-ravistelijalla. Koeputket laitettiin inkuboitumaan 16 h 50 °C vesihauteeseen.

Koeputket otettiin pois vesihauteesta 16 h inkuboinnin jälkeen ja niiden annettiin viilentyä huoneenlämpöisiksi. Koeputkiin lisättiin 3 ml natriumkloridia (5% NaCl MQ-vedessä) ja 5 ml heksaania. Koeputket suljettiin typpikaasuvirran alla, sekoitettiin vortex-ravistelijalla 30 s ja sentrifugoitiin 2 min (1500 rpm, 4 °C). Koeputkista pipetoitiin päällimmäinen eli orgaaninen kerros toisiin koeputkiin sentrifugoinnin jälkeen. Vanhoihin koeputkiin lisättiin uudestaan 3 ml NaCl ja 5 ml heksaania sekä koeputket sekoitettiin vortex-ravistelijalla ja sentrifugoitiin kuten edellä, koska kaikkien lipidien haluttiin olevan heksaanissa. Orgaaninen kerros otettiin taas talteen samoihin koeputkiin kuin aiemminkin.

Orgaanisen kerroksen koeputkiin lisättiin 3,5 ml 2 % kaliumbikarbonaattia (KHCO₃) ja koeputkista poistettiin alimmainen kerros kaksoispipetoinnilla. Orgaanisen kerroksen koeputkiin lisättiin vielä hieman vedetöntä natriumsulfaattia (NaSO₄) poistamaan vesi orgaanisesta kerroksesta. Orgaaninen kerros pipetoitiin vielä uusiin koeputkiin ilman, että NaSO₄ tuli mukana. Uudet koeputket haihdutettiin kuiviksi lämpölevyllä (35 °C) typpikaasuvirran alla.

Kuivattuihin koeputkiin lisättiin 1 ml heksaania, ja näytteet siirrettiin GC-pulloihin (Agilent Screw top vials, 2 ml). Makrolevien metyloidut lipidinäytteet laimennettiin GC-MS ajoa varten sisäisen standardin (C18:0-D3) pitoisuuden mukaan siten, että sisäisen standardin pitoisuus ajoon laitettaessa oli noin 3 ng/µl. *U. intestinalis* ja *C. tenuicorne* -lipidinäytteitä laimennettiin 10 x ja *C. glomerata* 50 x. Makrolevien metyloidut lipidinäytteet analysoitiin GC-MS laitteella yhdessä Supelco FAME 37 -mix laimennossarjan kanssa. Oliiviöljy käsiteltiin samoin kuin näytteet.

3.6 Fraktioinnin testaus

Makrolevien kokonaisrasvahappojen fraktiointia testattiin neutraalilipidistandardilla (mono-, di- ja triglyseridistandardi, 40 mg, catalog no. 1787-1AMP, Supelco) ja fosfolipidistandardilla (1,2-Dipalmitoyl-rac-glysero-3-phosphocholinestandardi, 100 mg, catalog no. 2644-64-6, Sigma-Aldrich). Fraktioinnin onnistumista testattiin

kiinteäfaasiuuton optimointiohjeen (solid phase extraction eli SPE optimization) mukaan (Arsenault 2012). Menetelmässä standardiliuosta laitetaan patruunan (Sep-Pak Silica Cartridges 50 mg, Waters, USA) läpi yhdessä liuottimien kanssa, sekä standardiliuosta ruiskutetaan suoraan koeputkeen ilman, että standardiliuos kulkee patruunan läpi. Molemmissa näytteissä lopullisessa liuoksessa pitäisi olla sama standardiliuoksen pitoisuus. Fosfolipidistandardin fraktioinnin testauksessa käytettiin 3 rinnakkaista näytettä ja yhtä nollanäytettä. Neutraalilipidistandardin fraktioinnissa käytettiin 4 rinnakkaista näytettä sekä yhtä nollanäytettä.

Alkuperäistä fosfolipidistandardia (100 mg) laimennettiin 122,15 ng/μl pitoisuuteen metanolin kanssa. Fosfolipidistandardin 122,15 ng/μl pitoisuudesta valmistettiin käyttöliuos, jossa jokaiseen rinnakkaiseen näytteeseen käytettiin 100 μl standardiliuosta ja 900 μl metanolia. Alkuperäistä neutraalilipidistandardia (40 mg) laimennettiin 640 ng/μl pitoisuuteen heksaanissa. Neutraalilipidistandardin 640 ng/μl pitoisuudesta valmistettiin käyttöliuos, jossa jokaiseen rinnakkaiseen näytteeseen kului 200 μl standardiliuosta ja 800 μl heksaani-dietyylieetteriä (1:1 -vol/vol).

50 mg silikaattipatruunat kostutettiin ensin 1 ml:lla metanolia fosfolipidistandardin ja 1 ml:lla heksaani-dietyylieetteriä neutraalilipidistandardin tapauksessa. Silikaattipatruunaan lisättiin 1 ml standardiliuoksien käyttöläimennoksia (fosfolipidistandardin pitoisuus 12,215 ng/μl; neutraalilipidistandardin pitoisuus 128 ng/μl) ennen kuin edellinen neste oli kokonaan valunut patruunasta koeputkeen. Silikaattipatruuna huuhdeltiin tämän jälkeen käytetystä standardista riippuen 3 ml:lla joko metanolia tai heksaani-dietyylieetteriä siten, että silikaatin ei annettu missään vaiheessa kuivua. Koeputket haihdutettiin kuiviin liuoksien valumisen jälkeen metylointia varten.

Seuraavaksi fosfolipidistandardin ja neutraalilipidistandardin käyttöliuoksia pipetoitiin suoraan uusiin, tyhjiin koeputkiin sama määrä kuin patruunankin läpi. 50 mg silikaattipatruuna kostutettiin 1 ml:lla metanolia tai heksaani-dietyylieetteriä, sekä silikaattipatruunat huuhdeltiin 3 ml:lla tarvittavaa liuosta. Koeputket laitettiin tippikaasuvirran alle haihtumaan metylointia varten. Fosfo- ja neutraalilipidistandardit metyloitiin samalla tavalla kuin varsinaiset näytteet. Metyloinnin ja GC-MS -ajon jälkeen pystyttiin laskemaan neutraalilipidistandardin ja fosfolipidistandardin talteenoton prosenttiosuus vertaamalla keskenään patruunan läpi syötettyjen ja suoraan koeputkeen pipetoitujen standardirasvahappojen määriä (Kaava 1). Neutraalilipidistandardia oli saatu talteen 83 % ja fosfolipidistandardia 76 %.

$$\% \text{ talteenotto} = 100 * \left(\frac{\text{Näytepitoisuus silikaattipatruunan läpi}}{\text{jälkeenlisätty näytepitoisuus}} \right)$$

Kaava 1. Standardien talteenoton prosentin laskeminen.

Fraktiointia testattiin myös valuttamalla molemmat standardit saman silikaattipatruunan läpi. Molempien standardien fraktioinnissa käytettiin kahta rinnakkaista näytettä. Alkuperäistä neutraalilipidistandardia (pitoisuus 20000 ng/μl) laimennettiin ensin 640 ng/μl pitoisuuteen heksaanissa. Fraktioinnin testauksessa käytettiin fosfolipidistandardin 122,15 ng/μl pitoisuutta. Neutraali- ja fosfolipidistandardista valmistettiin yhteinen käyttöliuos heksaani-dietyylieetterissä, josta yhteisestä käyttöliuoksesta valutettiin 200 μl neutraalilipidistandardia ja 100 μl fosfolipidistandardia sekä 700 μl heksaani-dietyylieetteriä silikaattipatruunan läpi.

Samassa liuoksessa olevien standardien fraktiointi aloitettiin erottamalla neutraalilipidifraktio molemmat testattavat standardit sisältävästä käyttöliuoksesta. 50 mg silikaattipatruuna kostutettiin 1 ml:lla heksaani-dietyylieetteriä ja nesteen annettiin valua patruunasta koeputkiin niin, ettei patruuna päässyt kuivumaan. Silikaattipatruunaan lisättiin 1 ml neutraali- ja fosfolipidistandardin yhteistä käyttöliuosta (neutraalilipidistandardin pitoisuus 128 ng/μl; fosfolipidistandardin pitoisuus 12,215 ng/μl). Silikaattipatruuna huuhdeltiin standardiliuoksen laittamisen jälkeen 15 ml:lla heksaani-dietyylieetteriä, jotta patruuna saatiin kunnolla huuhdeltua. Näin varmistettiin, ettei patruunaan jäänyt erotteluun haluttuja lipidifraktioita, tässä tapauksessa siis neutraalilipidejä. Neutraalilipidistandardin fraktiointi tehtiin heksaani-dietyylieetterillä. Koeputket haihdutettiin kuiviksi typpikaasuvirran alla metyloinnin aloitusta varten.

Samat patruunat siirrettiin uusiin koeputkiin eli aloitettiin fosfolipidistandardin fraktiointi. Edellisessä fraktioinnissa käytetyt silikaattipatruunat kostutettiin 1 ml:lla metanolia, ja patruunan ei annettu kuivua. Patruunaan lisättiin vielä 1 ml metanolia, jonka jälkeen silikaattipatruuna huuhdeltiin 5 ml:lla metanolia. Kun kaikki neste oli valunut koeputkiin, ne laitettiin typpikaasuvirran alle haihtumaan.

Neutraali- ja fosfolipidistandardin yhteistä käyttöliuosta pipetoitiin 1 ml myös suoraan tyhjiin koeputkiin. Uudet silikaattipatruunat kostutettiin 1 ml:lla heksaani-dietyylieetteriä ja patruunaa huuhdeltiin vielä 5 ml:lla heksaani-dietyylieetteriä. Koeputket haihdutettiin typpikaasuvirran alla metyloinnin aloitusta varten. Standardien talteenottoprosentti laskettiin kaavaa 1 käyttäen. Neutraali- ja fosfolipidistandardin yhteisestä käyttöliuoksesta neutraalilipidistandardia saatiin talteen 98 % ja fosfolipidistandardia 62 %.

3.7 Näytteiden neutraalilipidien fraktiointi

Makrolevien lipidien fraktiointi aloitettiin haihduuttamalla lipidieristyskoeputket kuiviksi. Haihtumisen jälkeen putkiin lisättiin 1,5 ml heksaani-dietyylieetteriä. Näytteiden fraktioinnin mukana fraktioitiin myös neutraali- ja fosfolipidistandardin yhteistä käyttöliuosta. Tämän perusteella tiedettiin, paljonko standardia on tullut fraktioinnissa läpi. Ainoastaan *U. intestinalis* -viherlevän elokuun ja lokakuun kokonaislipidinäytteet fraktioitiin.

Ulva -levien kokonaislipidien fraktioinnissa silikaattipatruunat kostutettiin 1 ml:lla heksaani-dietyylieetteriä ja annettiin nesteen valua patruunan läpi koeputkeen. Neutraali- ja fosfolipidistandardin yhteistä käyttöliuosta pipetoitiin 1 ml suoraan tyhjään koeputkeen (1 ml = 200 µl neutraalilipidistandardia, 100 µl fosfolipidistandardia sekä 700 µl heksaani-dietyylieetteriä). Silikaattipatruunaan lisättiin sitten 1 ml *Ulva* -levän kokonaislipidinäytettä ja annettiin nesteen valua patruunan läpi. Patruunaan lisättiin 1 ml neutraali- ja fosfolipidistandardin yhteistä käyttöliuosta. Patruunan ei annettu kuivua missään vaiheessa.

Patruunaan lisättiin näytteen jälkeen 15 ml heksaani-dietyylieetteriä eli näyte huuhdeltiin kunnolla pois patruunasta eli fraktioitiin neutraalilipidit pois kokonaislipidinäytteestä. Kun liuotin oli valunut patruunan läpi, koeputket haihduutettiin kuivaksi typpikaasuvirran alla metyloinnin aloitusta varten. *Ulva* -viherlevien fraktioidut neutraalilipidinäytteet metyloitiin samalla tavalla kuin kokonaislipidit. 500 µl oliiviöljyä metyloitiin myös *Ulva* -levien neutraalilipidinäytteiden kanssa seuraamaan metyloinnin onnistumista. *Ulva* -levien neutraalilipidinäytteisiin lisättiin sisäistä standardia (C18:0-D3) siten, että sisäisen standardin lopullinen pitoisuus oli n. 3 ng/µl. *U. intestinalis* -viherlevän neutraalilipidinäytteet laimennettiin GC-MS ajoa varten viiden kertaisesti. Oliiviöljy sekä neutraali- ja fosfolipidistandardin yhteinen näyte laimennettiin 100 x.

3.8 Tilastolliset testit

Aineistoa testattiin IBM® SPSS versio 22 -tilasto-ohjelman avulla. Aineiston normaalisuusoletuksen toteutumista testattiin Kolmogorov-Smirnovin ja Shapiro-Wilkin testeillä, jossa luotettavammaksi testiksi osoittautui Shapiro-Wilkin testi, koska aineiston koko oli alle 50. Levenin testillä testattiin, ovatko muuttujien varianssit yhtä suuret. Normaalisuusoletuksen toteutuessa aineistoa analysoitiin faktorikokeen kaksisuuntaisella

varianssianalyysillä, jossa testattiin muuttujien välisiä vaikutuksia ja yhteisvaikutusta. Aineisto analysoitiin ei-parametrisella Kruskal-Wallis varianssianalyysillä, jos aineisto ei ollut parametrisen. Kaikki luokiteltavat muuttujat olivat kiinteitä. Muuttujien väliset vuorovaikutukset testattiin yksisuuntaisen varianssianalyysin avulla.

Makrolevien rasvahapoille tehtiin pääkomponenttianalyysi (principal component analysis, PCA), jotta voitiin tarkastella usean muuttujan sisältävää aineistoa. Pääkomponenttianalyysi on monimuuttujamenetelmä, jossa usean muuttujan aineistosta etsitään ulottuvuuksia eli pääkomponentteja, jotka selittäisivät suurimman osan aineiston vaihtelusta. Ensimmäinen pääkomponentti selittää suurimman osan muuttujien vaihtelusta ja seuraavat pääkomponentit vähemmän kuin ensimmäinen. Pääkomponenttianalyysin avulla voidaan tarkastella rasvahappojen välisiä suhteita menettämättä rasvahappojen välisten vaihtelujen informaatiota. Merkitsevyystasoksi asetettiin $p < 0,05$.

4. Tulokset

4.1 Makrolevien märkäpaino ja kuivapaino

Elokuun kokeessa jokaisessa koealtaassa oli kokeen alussa noin 5 g makrolevää (Kuva 3). *U. intestinalis* -levän märkäpaino oli suurimmassa osassa käsittelyjä kokeen lopussa pienempi kuin kokeen alussa. Esimerkiksi fosforilisäyksessä (P) ja typpi- ja fosforilisäyksessä (N+P) *U. intestinalis* -levän märkäpaino oli alkutilannetta pienempi kokeen lopussa. Paljon vaihtelua havaittiin *U. intestinalis* -levän märkäpainossa erityisesti kontrollikäsittelyissä (C). *C. glomerata* -levän märkäpaino nousi kokeen lopussa kaikissa käsittelyissä, eniten kontrolli- (C) ja fosforilisäyskäsittelyissä (P) (Kuva 3).

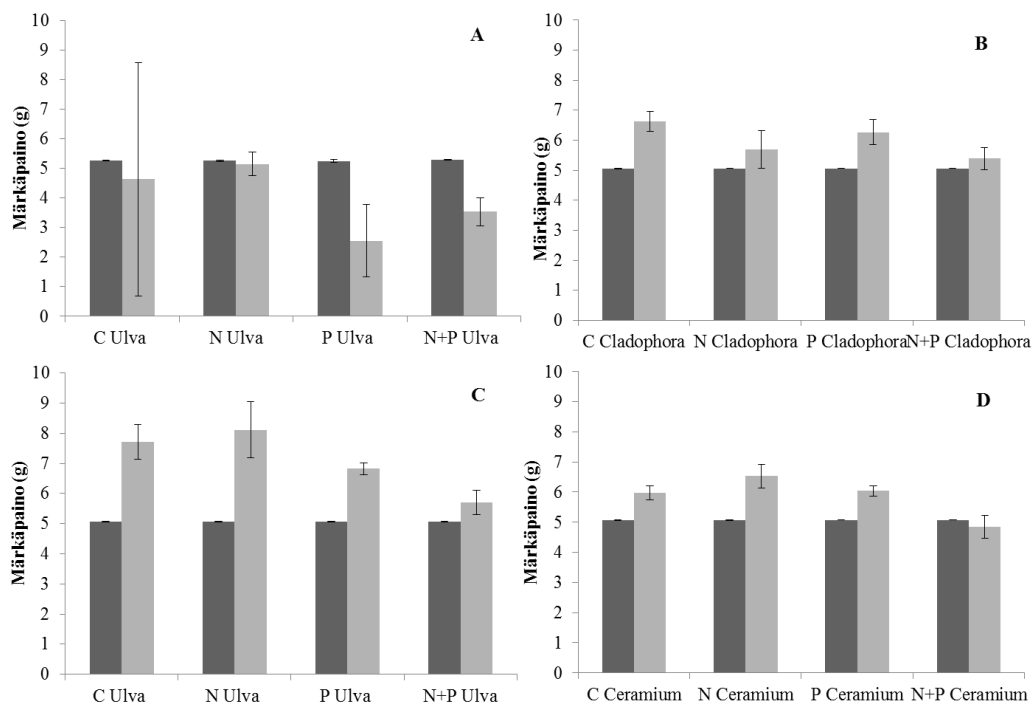
Lokakuun kokeessa *U. intestinalis* -levän märkäpaino kasvoi jokaisessa käsittelyssä (Kuva 3). Erityisesti kontrollikäsittelyssä (C) ja typpilisäyskäsittelyissä (N) *U. intestinalis* -levän märkäpaino kasvoi verrattuna kokeen alkuun. *C. tenuicorne* -levän märkäpaino kasvoi myös jokaisessa käsittelyssä, paitsi typpi- ja fosforilisäyskäsittelyissä (N+P). *C. tenuicorne* -levän märkäpaino kasvoi erityisesti typpilisäyskäsittelyissä (N).

Makrolevien märkäpainot erosivat toisistaan kokeen lopussa merkitsevästi lajeittain (Kaksisuuntainen varianssianalyysi: $F_{3,16}=7,680$; $p=0,002$), mutta eivät käsittelyittäin

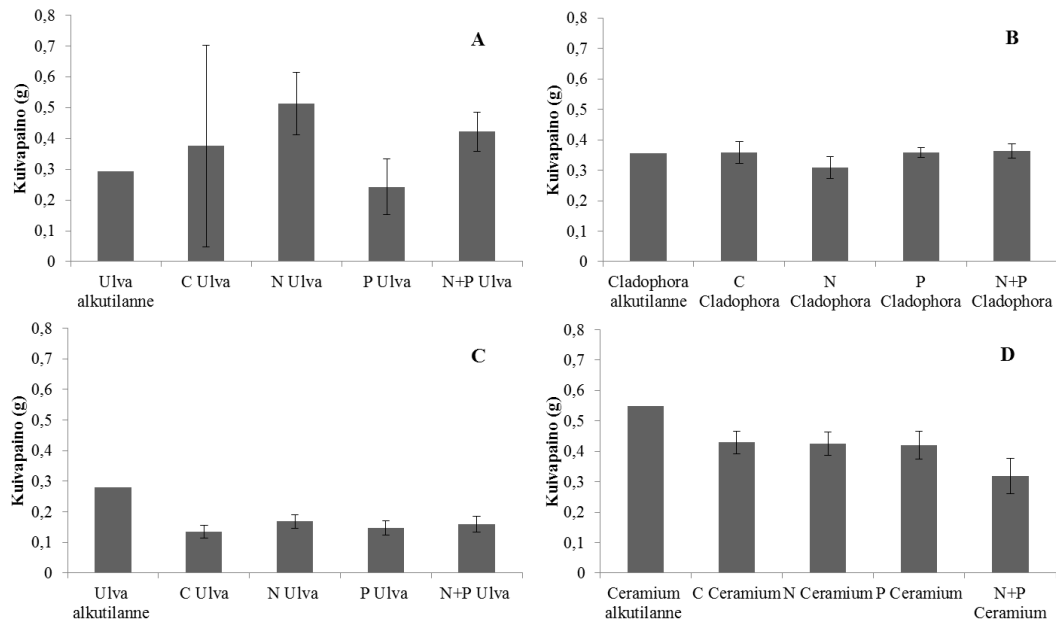
(Kaksisuuntainen varianssianalyysi: $F_{3,16}=2,282$; $p=0,118$) (Taulukko 4). Elokuun *U. intestinalis* -levän märkápainot erosivat kaikkien muiden makrolevien märkápainosta.

Makrolevien kuivapainot vaihtelivat eri käsittelyiden välillä, mutta eivät merkitsevästi (Kruskal-Wallis: $\chi^2=0,774$; $df=4$; $p=0,942$) (Kuva 4). Makrolevien kuivapainot erosivat toisistaan lajeittain (Kruskal-Wallis: $\chi^2=36,175$; $df=3$; $p<0,001$). Makrolevien alkutilanteen kuivapainot punnittiin erillisistä näytteistä. Elokuun *U. intestinalis* -levän käsittelyiden sisällä kuivapainojen välillä oli paljon vaihtelua. *C. glomerata* -levän kuivapainot eivät vaihdelleet niin paljon käsittelyiden välillä.

Lokakuun kokeen *U. intestinalis* -levän kuivapainot olivat hieman pienempiä kuin *C. tenuicorne* -levän, mutta molemmilla levälajeilla kuivapainot eivät eronneet paljon toisistaan eri käsittelyiden välillä (Kuva 4). Lokakuun *U. intestinalis* -levän kuivapainot olivat selvästi pienemmät kuin elokuun *U. intestinalis* -levän.



Kuva 3. Makrolevien märkápainot A= *Ulva intestinalis* elokuussa, B= *Cladophora glomerata* elokuussa, C= *Ulva intestinalis* lokakuussa ja D= *Ceramium tenuicorne* lokakuussa. Tumma palkki makrolevien märkápainon keskiarvo kokeen alussa ja vaalea palkki kokeen lopussa sekä märkápainojen keskihajonnat.



Kuva 4. Makrolevien kuivapainot ja keskihajonnat kokeen alussa ja lopussa, A= *Ulva intestinalis* elokuussa, B= *Cladophora glomerata* elokuussa, C= *Ulva intestinalis* lokakuussa ja D= *Ceramium tenuicorne* lokakuussa.

4.2 Vesinäytteiden ravinnepitoisuus

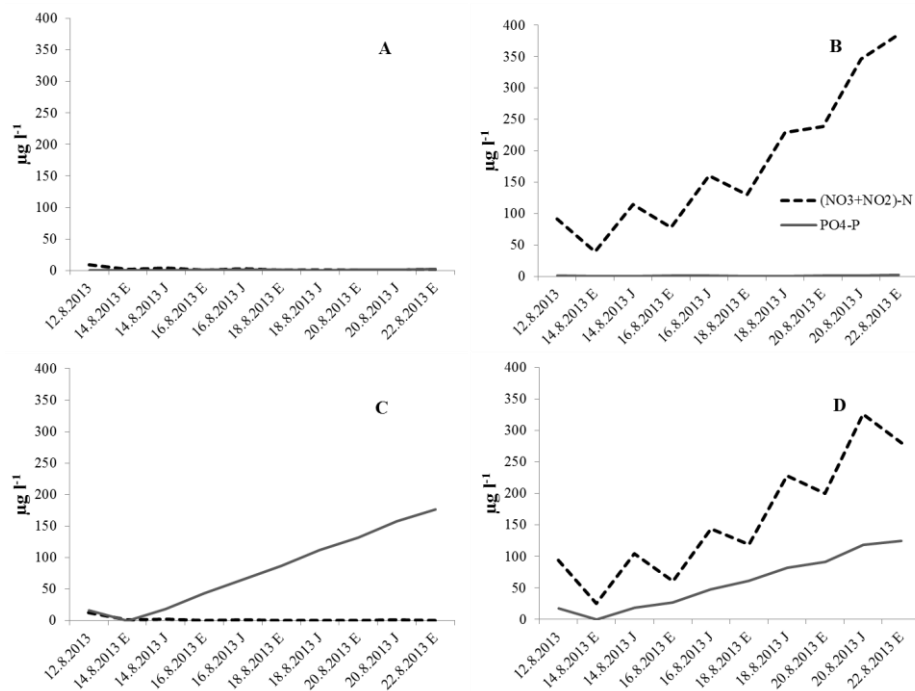
Koealtaista mitattiin joka toisena päivänä veden nitraatti- ($(\text{NO}_3 + \text{NO}_2)\text{-N}$) ja fosfaattipitoisuus ($(\text{PO}_4)\text{-P}$). Ravinnenäytteet otettiin ennen (E) ja jälkeen (J) ravinnelisyksen. Tutkittavat makrolevät saivat samanlaisen ravinnekäsittelyn, koska altaiden nitraatti- ja fosfaattifosforipitoisuus olivat samat tutkittavien makrolevälajien välillä ennen ja jälkeen ravinnelisyksen. Kontrollikäsittelyissä (C) ravinnepitoisuudet pysyivät matalina koko kokeen aikana sekä elokuussa että lokakuussa (Kuvat 5,6,7 & 8). Makrolevät käyttivät kaikki altaisiin lisättävät ravinteet tehokkaasti hyödyksi.

Typpilisäykäsittelyissä (N) nitraatin pitoisuus kasvoi kokeen edetessä sekä elokuun että lokakuun kokeen aikana (Kuvat 5,6,7 & 8). Muut ravinnepitoisuudet pysyivät matalina. Kokeen alussa makrolevät pystyivät hyödyntämään typpeä, mutta kokeen edetessä makrolevät eivät enää käyttäneet tai tarvinneet nitraattia.

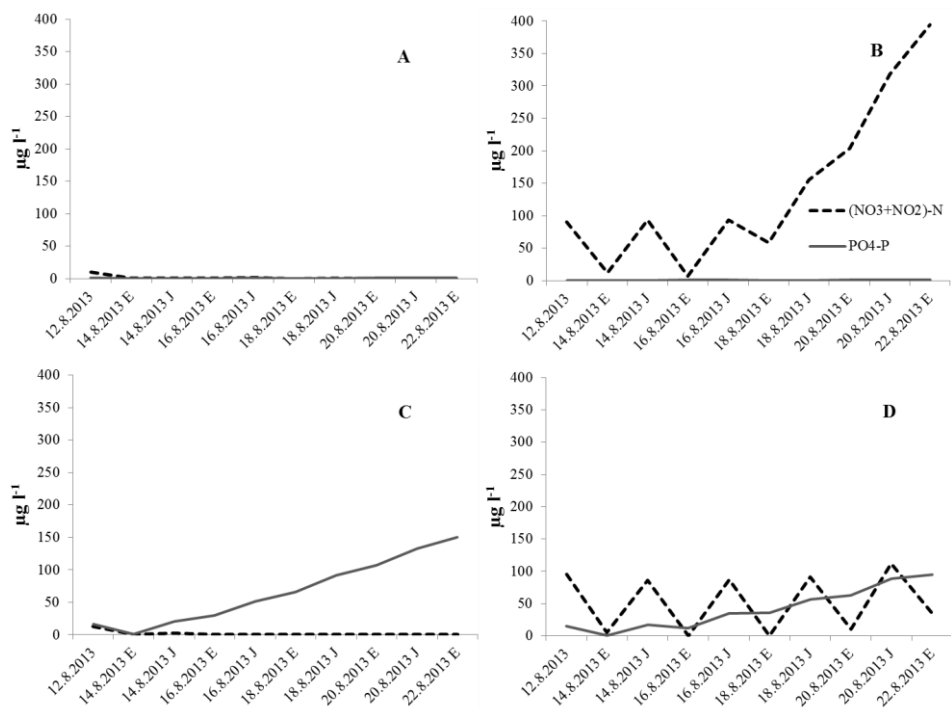
Fosforilisäykäsittelyissä (P) fosfaattifosforin pitoisuus kasvoi kaikissa altaissa (Kuvat 5,6,7 & 8). Makrolevät eivät tarvinneet ylimääräistä fosfaattifosforia. Muiden ravinteiden pitoisuudet pysyivät matalina kokeen aikana lisäyksistä huolimatta.

Typpi- ja fosforilisäyskäsittelyissä (N+P) erityisesti nitraatin pitoisuudet vaihtelivat eri koealtaissa (Kuvat 5,6,7 & 8). Elokuun *U. intestinalis* -altaassa nitraattipitoisuus kasvoi kokeen edetessä, kun taas *C. glomerata* -altaassa nitraatin pitoisuus ei kasvanut kokeen edetessä vaan levät pystyivät hyödyntämään lisätyt ravinteet (Kuvat 5 & 6). Lokakuun *U. intestinalis* -altaissa nitraatin pitoisuudet eivät myöskään kasvaneet eikä edellisen päivän lisäyksiä tarvittu (Kuva 7). *C. tenuicorne* -altaissa nitraatin pitoisuus kasvoi kokeen edetessä (Kuva 8).

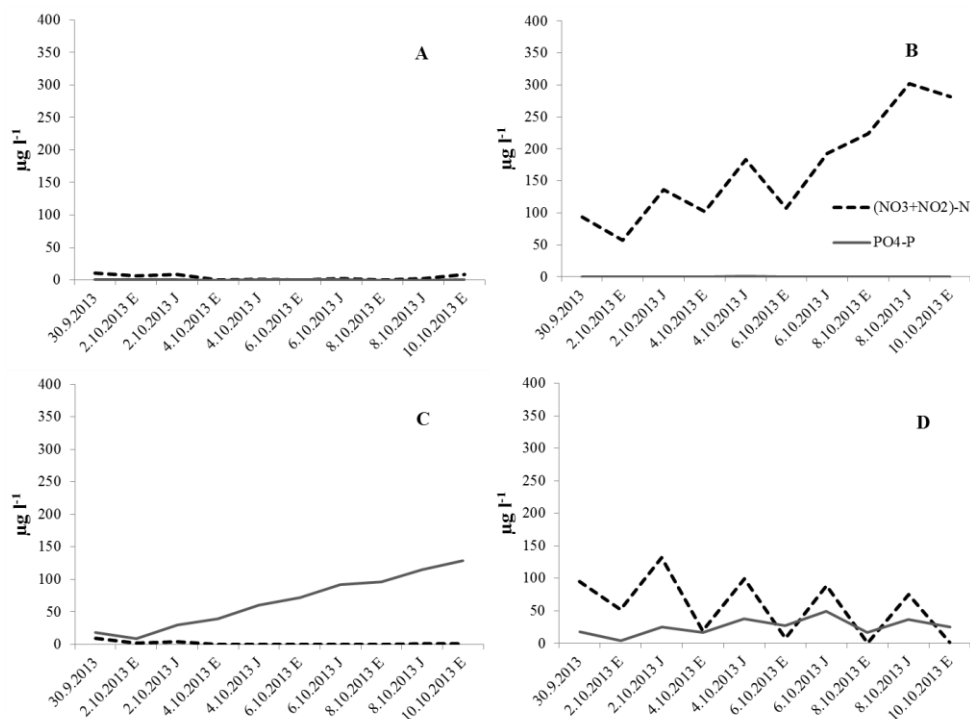
Typpi- ja fosforilisäyskäsittelyissä (N+P) fosfaattifosforipitoisuus kasvoi hieman kokeen loppua kohti, mutta ei niin jyrkästi kuin pelkissä fosforilisäyskäsittelyissä (P). Makrolevien kasvua rajoitti enemmän nitraatti kuin fosfaattifosfori, ja lokakuun *U. intestinalis* -levä käytti ravinteita hyödykseen paremmin kuin elokuun *U. intestinalis* -levä (Kuvat 5 & 7).



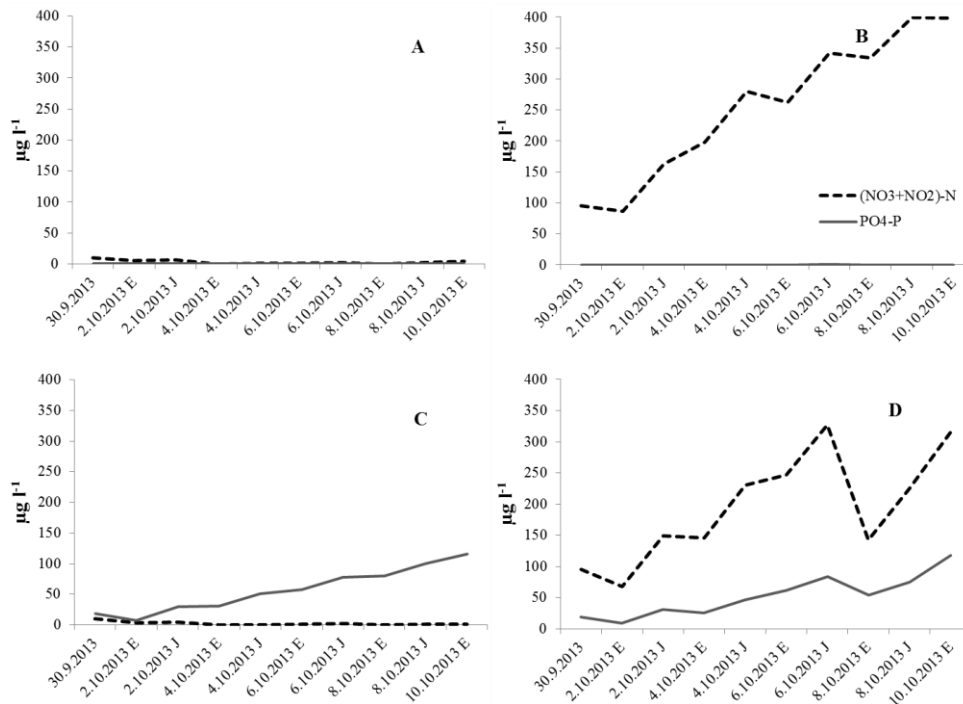
Kuva 5. Vesinäytteiden ravinnepitoisuudet *Ulva intestinalis* -levän elokuun altaissa, A= kontrollikäsittely, B= typpilisäyskäsittely, C= fosforilisäyskäsittely ja D= typpi- ja fosforilisäyskäsittely.



Kuva 6. Vesinäytteiden ravinnepitoisuudet *Cladophora glomerata* -levän elokuun altaissa, A= kontrollikäsittely, B= typpilisäyskäsittely, C= fosforilisäyskäsittely ja D= typpi- ja fosforilisäyskäsittely.



Kuva 7. Vesinäytteiden ravinnepitoisuudet *Ulva intestinalis* -levän lokakuun altaissa, A= kontrollikäsittely, B= typpilisäyskäsittely, C= fosforilisäyskäsittely ja D= typpi- ja fosforilisäyskäsittely.



Kuva 8. Vesinäytteiden ravinnepitoisuudet *Ceramium tenuicorne* -levän lokakuun altaissa, A= kontrollikäsitteily, B= typpilisäyskäsitteily, C= fosforilisäyskäsitteily ja D= typpi- ja fosforilisäyskäsitteily.

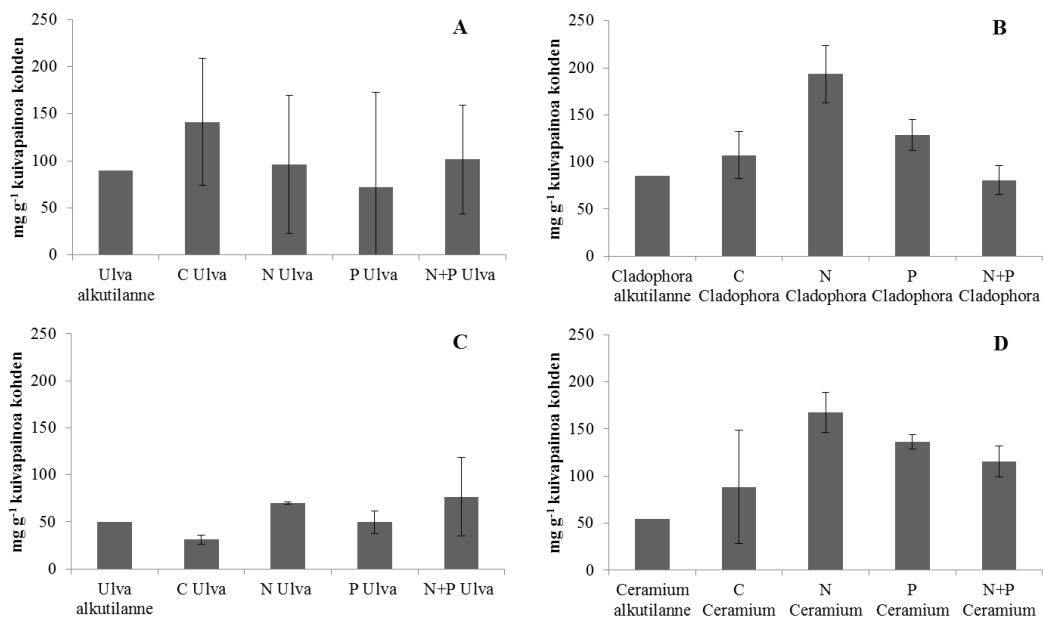
4.3 Makrolevien kokonaislipidit

Makrolevien kokonaislipidimäärien välillä oli eroavuuksia lajien (Kaksisuuntainen varianssianalyysi: $F_{3,16}=3,422$; $p=0,043$) (Yksisuuntainen varianssianalyysi: $F_{3,32}=4,054$; $p=0,015$), mutta ei käsittelyiden välillä (Kaksisuuntainen varianssianalyysi: $F_{4,16}=1,578$; $p=0,228$) (Taulukko 4). Makrolevälajien ja käsittelyiden välillä ei ollut merkitsevää yhteisvaikutusta (Kaksisuuntainen varianssianalyysi: $F_{12,16}=0,914$; $p=0,555$). Elokuun kokeessa *U. intestinalis* -levän kokonaislipidimäärät vaihtelivat välillä 72–141 mg g⁻¹ kuivapainoa kohden (Kuva 9). Suurimmat kokonaislipidimäärät mitattiin kontrollikäsitteilystä (C). Vähiten kokonaislipidejä oli elokuun *U. intestinalis* -levällä fosforilisäyskäsitteilyssä (P). Elokuun *U. intestinalis* -levän kokonaislipidimäärät olivat nousseet kaikissa muissa käsittelyissä yli alkutilanteen paitsi fosforilisäyskäsitteilyssä. Elokuun *U. intestinalis* -levän käsittelyiden sisällä oli havaittavissa paljon vaihtelua kokonaislipidimäärissä. Elokuun näytteiden *C. glomerata* -levän kokonaislipidit vaihtelivat välillä 81–193 mg g⁻¹ kuivapainoa kohden (Kuva 9). *C. glomerata* -levän suurimmat kokonaislipidimäärät mitattiin typpilisäyskäsitteilystä (N) ja pienimmät typpi-

ja fosforilisäyskäsittelystä (N+P). Kokonaislipidimäärät olivat alkutilannetta suuremmat suurimmassa osassa ravinne­käsittelyjä. Elokuun *U. intestinalis* ja *C. glomerata* -levien kokonaislipidimäärät eivät eronneet toisistaan merkitsevästi (Taulukko 4).

Lokakuun kokeen *U. intestinalis* -levän kokonaislipidimäärät vaihtelivat välillä 31–76 mg g⁻¹ kuivapainoa kohden (Kuva 9). Suurimmat kokonaislipidimäärät mitattiin lokakuun *U. intestinalis* -levällä typpi- ja fosforilisäyskäsittelystä (N+P), kun taas pienimmät arvot kontrollikäsittelystä (C). Lokakuun *C. tenuicorne* -levän kokonaislipidimäärät vaihtelivat välillä 54–168 mg g⁻¹ kuivapainoa kohden. Suurimmat arvot mitattiin typpilisäyskäsittelystä (N) ja pienimmät alkutilanteesta (Kuva 9). Lokakuun *U. intestinalis* sisälsi vähemmän lipidejä kuin *C. tenuicorne* (Kaksisuuntainen varianssianalyysi: F_{1,8}=17,112; p=0,003) (Taulukko 4). Lokakuun *U. intestinalis* -levän kokonaislipidimäärät olivat myös pienemmät kuin elokuun *U. intestinalis* ja *C. glomerata* -levien kokonaislipidimäärät.

Makrolevien kokonaislipidimäärien osuudet makrolevien kuivapainosta olivat pienet. Elokuun *U. intestinalis* -levän kokonaislipidit käsittivät 1,5% viherlevän kuivapainosta, mutta *C. glomerata* -levällä kokonaislipidit käsittivät 1,9% levän kuivapainosta. Lokakuussa *U. intestinalis* -levän kokonaislipidimäärä oli 1,8% kuivapainosta ja *C. tenuicorne* -levän 1,6% kuivapainosta.



Kuva 9. Makrolevien kokonaislipidimäärät mg g⁻¹ kuivapainoa kohden sekä keskihajonnat, A= *Ulva intestinalis* elokuussa, B= *Cladophora glomerata* elokuussa, C= *Ulva intestinalis* lokakuussa ja D= *Ceramium tenuicorne* lokakuussa.

Taulukko 4. Kaksisuuntaisen varianssianalyysin tuloksia. Merkitsevät p-arvot lihavoitu.

Tutkittu muuttuja	Selittävät muuttujat	df	MS	F	p
Makrolevien märkäpaino kokeen lopussa	Levälaji	3	13,511	7,68	0,002
	Käsittely	3	4,015	2,282	0,118
	Levälaji x Käsittely	9	0,864	0,491	0,86
Kokonaislipidit (elokuu ja lokakuu)	Levälaji	3	6830,682	3,422	0,043
	Käsittely	4	3150,621	1,578	0,228
	Levälaji x Käsittely	12	1823,932	0,914	0,555
Kokonaislipidit elokuussa	Levälaji	1	1503,291	0,47	0,513
	Käsittely	4	2096,258	0,655	0,64
	Levälaji x Käsittely	4	3038,54	0,949	0,484
Kokonaislipidit lokakuussa	Levälaji	1	13537,616	17,112	0,003
	Käsittely	4	2467,539	3,119	0,08
	Levälaji x Käsittely	4	1020,08	1,289	0,351
Kokonaisrasvahapot (elokuu ja lokakuu)	Levälaji	3	1,09	52,17	<0,001
	Käsittely	4	0,029	1,396	0,28
	Levälaji x Käsittely	12	0,025	1,212	0,353
Kokonaisrasvahapot elokuussa	Levälaji	1	0,9	40,296	<0,001
	Käsittely	4	0,027	1,2	0,382
	Levälaji x Käsittely	4	0,02	0,885	0,514
Kokonaisrasvahapot lokakuussa	Levälaji	1	0,441	22,63	0,001
	Käsittely	4	0,038	1,965	0,193
	Levälaji x Käsittely	4	0,02	1,047	0,441
<i>Ulva intestinalis</i> neutraalilipidit	Levälaji	1	0,56	15,718	0,004
	Käsittely	4	0,089	2,509	0,125
	Levälaji x Käsittely	4	0,05	1,416	0,312

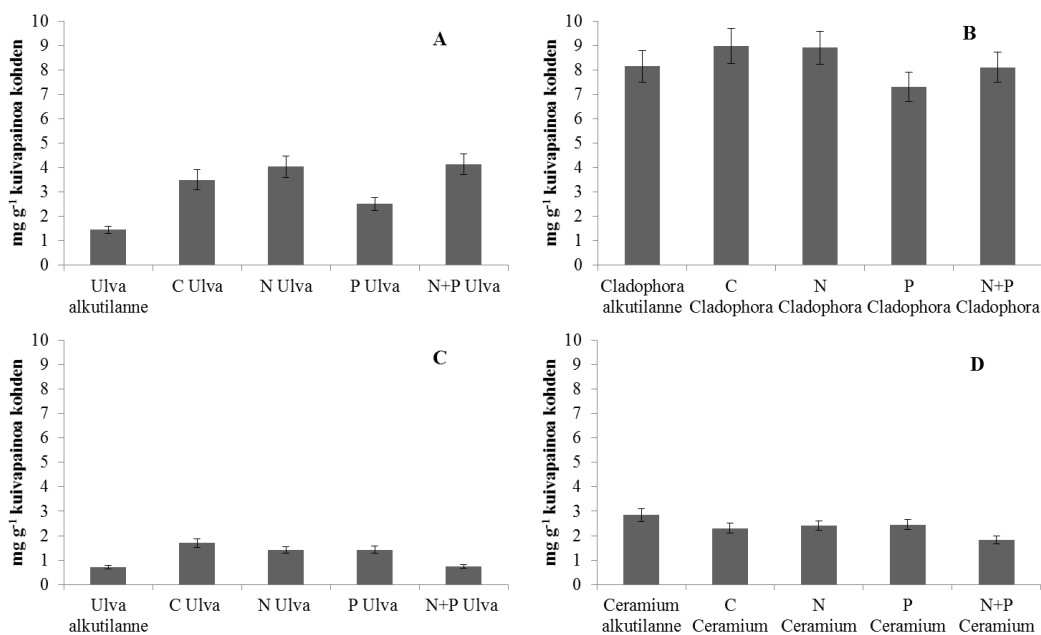
4.4 Makrolevien rasvahapot

Makrolevien kokonaisrasvahappomäärät erosivat merkitsevästi lajeittain (Kaksisuuntainen varianssianalyysi: $F_{3,16}=52,170$; $p<0,001$), mutta eivät käsittelyittäin toisistaan (Kaksisuuntainen varianssianalyysi: $F_{4,16}=1,396$; $p=0,28$) (Kuva 10) (Taulukko 4). Yhteisvaikutusta ei havaittu levälajien ja käsittelyiden välillä (Kaksisuuntainen varianssianalyysi: $F_{12,16}=1,212$; $p=0,353$). Elokuun kokeessa *C. glomerata* sisälsi enemmän rasvahappoja kuin *U. intestinalis* (Kaksisuuntainen varianssianalyysi: $F_{1,8}=40,296$; $p<0,001$) (Taulukko 4). *C. glomerata* -levän kokonaisrasvahappomäärät vaihtelivat välillä 7,3–9,0 mg g⁻¹ kuivapainoa kohden, kun taas *U. intestinalis* -levän kokonaisrasvahappomäärät vaihtelivat välillä 1,5–4,1 mg g⁻¹ kuivapainoa kohden (Kuva 10). *U. intestinalis* -levän suurimmat kokonaisrasvahappomäärät löytyivät typpilisäys- (N) sekä typpi- ja fosforilisäyskäsittelystä (N+P). *C. glomerata* -levän korkeimmat kokonaisrasvahappomäärät löytyivät taas kontrolli- (C) ja typpilisäyskäsittelystä (N).

Lokakuun kokonaisrasvahappomäärät olivat pienemmät molemmilla makrolevälajeilla verrattuna elokuun kokeeseen (Kuva 10). Lokakuun kokeessa *U. intestinalis* -levän

kokonaisrasvahappomäärät vaihtelivat välillä 0,7-1,7 mg g⁻¹ kuivapainoa kohden ja *C. tenuicorne* -levän kokonaisrasvahappomäärät välillä 1,8–2,8 mg g⁻¹ kuivapainoa kohden. Lokakuun *U. intestinalis* -levän korkeimmat kokonaisrasvahappomäärät löytyivät kontrollikäsitteystä (C), kun taas *C. tenuicornen* korkeimmat kokonaisrasvahappomäärät olivat alkutilanteen näytteessä (Kuva 10). Lokakuun *U. intestinalis* -levän kokonaisrasvahappomäärät olivat pienemmät kuin *C. tenuicorne* -levän (Kaksisuuntainen varianssianalyysi: F_{1,8}=22,630; p=0,001) (Taulukko 4).

Makrolevillä rasvahappojen osuus kokonaislipidimäärästä oli pieni. Elokuun *U. intestinalis* -levän rasvahappojen osuus käsitti 3,9% kokonaislipideistä, kun taas *C. glomerata* -levän rasvahappojen osuus kokonaislipideistä oli 7,5%. Lokakuun *U. intestinalis* -levän kokonaislipidit koostuivat 2,7% rasvahapoista ja *C. tenuicorne* -levän 2,4% rasvahapoista.



Kuva 10. Makrolevien kokonaisrasvahappomäärät mg g⁻¹ kuivapainoa kohden, A= *Ulva intestinalis* elokuussa, B= *Cladophora glomerata* elokuussa, C= *Ulva intestinalis* lokakuussa ja D= *Ceramium tenuicorne* lokakuussa.

Elokuun ja lokakuun kokeiden makrolevien rasvahappokoostumukset erosivat hieman toisistaan (Taulukko 5). Kaikilla makrolevillä tyydyttyneiden rasvahappojen prosenttiosuudet olivat suuremmat kuin muut rasvahapporyhmät (42–50% kokonaislipideistä).

Taulukko 5. Makrolevien rasvahappokoostumus prosenttiosuuksina kokonaislipidimäärästä sekä rasvahappojen keskihajonnat. SFA= tyydyttyneet rasvahapot, MUFA= monityydyttymättömät rasvahapot ja PUFA= monityydyttymättömät rasvahapot, - = rasvahappoa ei löytynyt näytteestä, min = rasvahapon osuus alle 0,1%.

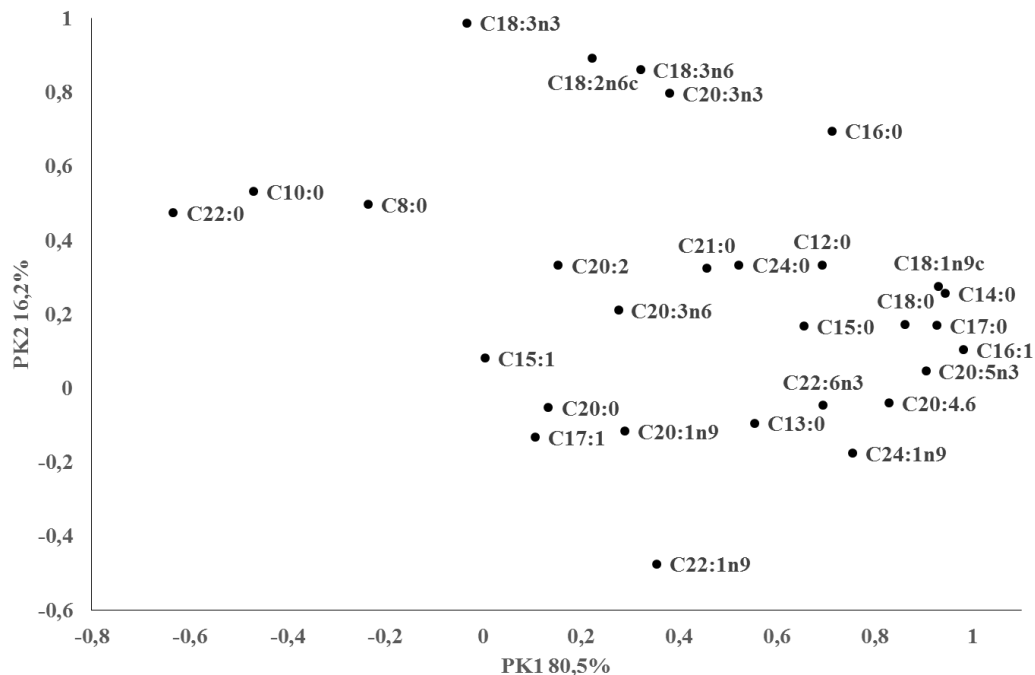
Rasvahappo	<i>Ulva intestinalis</i> elokuu	<i>Cladophora glomerata</i> elokuu	<i>Ulva intestinalis</i> lokakuu	<i>Ceramium tenuicorne</i> lokakuu
C4:0	-	-	-	-
C6:0	-	-	-	-
C8:0	min	min	min	-
C10:0	min	-	min	min
C11:0	-	-	-	-
C12:0	min	min	min	min
C13:0	min	min	min	min
C14:0	0,9±0,6	7,9±0,8	0,7±0,6	4,1±0,8
C15:0	0,3±0,2	0,2±0,0	0,3±0,1	0,5±0,1
C16:0	45,7±2,9	32,3±2,2	41,0±2,4	37,3±4,0
C17:0	0,1±0,1	0,2±0,0	0,3±0,1	0,3±0,1
C18:0	1,2±0,9	1,1±0,3	2,5±0,7	2,1±0,6
C20:0	0,3±0,1	0,1±0,0	0,7±0,2	0,4±0,1
C21:0	min	min	min	min
C22:0	1,0±0,6	0,1±0,0	1,3±0,3	0,4±0,1
C23:0	min	min	min	min
C24:0	0,2±0,1	0,1±0,0	0,3±0,1	0,3±0,1
Yht. SFA	49,7±10,9	42,0±7,7	47,1±9,5	45,5±8,7
C14:1	-	min	-	-
C15:1	min	min	0,1±0,1	min
C16:1	3,3±3,8	18,4±3,6	2,6±0,9	23,3±4,9
C17:1	0,1±0,4	min	0,2±0,2	0,2±0,1
C18:1N9t	-	-	-	-
C18:1N9c	1,5±0,5	16,0±1,8	2,7±1,1	5,6±0,4
C20:1N9	0,1±0,1	0,1±0,1	0,1±0,1	0,4±0,2
C22:1N9	0,1±0,1	0,2±0,1	0,3±0,2	1,7±0,8
C24:1N9	min	0,1±0,1	min	0,4±0,2
Yht. MUFA	5,2±1,8	34,9±7,3	6,0±1,2	31,6±7,4
C18:2N6t	min	min	-	min
C18:2N6c	12,8±4,7	5,8±1,6	14,6±3,9	2,7±0,6
C18:3N6	0,7±0,2	0,3±0,1	0,9±0,2	0,4±0,1
C18:3N3	28,5±6,0	8,6±1,8	26,9±3,9	1,4±0,4
C20:2	0,1±0,0	min	0,1±0,1	0,2±0,0
C20:3N6	0,2±0,1	0,1±0,1	0,3±0,1	0,5±0,3
C20:4N6	0,7±0,2	1,2±0,3	1,1±0,3	3,5±0,5
C20:3N3	0,2±0,1	0,1±0,0	0,1±0,1	min
C20:5N3	1,8±0,6	6,8±1,1	2,7±0,8	13,7±4,0
C22:2	-	-	-	-
C22:6n3	0,1±0,2	0,2±0,1	0,3±0,1	0,4±0,1
Yht. PUFA	45,1±8,5	23,2±3,3	46,9±8,6	22,8±4,0
Yht. of n-3	30,5	15,6	29,9	15,6
Yht. of n-6	14,5	7,5	16,9	7,1
Suhde n6/n3	0,47	0,48	0,56	0,46

Kertatyydyttymättömien ja monityydyttymättömien rasvahappojen osuudet vaihtelivat lajista riippuen. Esimerkiksi elokuun *C. glomerata* ja lokakuun *C. tenuicorne* -levillä kertatyydyttymättömien rasvahappojen prosenttiosuudet (35%; 32%) olivat suuremmat kuin monityydyttymättömien rasvahappojen prosenttiosuudet (23%; 23%). Elokuun ja lokakuun *U. intestinalis* -levillä monityydyttymättömien rasvahappojen prosenttiosuudet (45%; 47%) olivat paljon suuremmat kuin kertatyydyttymättömien rasvahappojen (5%; 6%). Kaikkien makrolevien omega-6/omega-3 suhde oli alle 1 (Taulukko 5).

Kaikissa makrolevissä rasvahapon C16:0 osuus oli muita yksittäisiä rasvahappoja korkeampi (Taulukko 5). *U. intestinalis* -levästä löytyi myös suuria määriä C18:2n6c ja C18:3n3 rasvahappoja. *C. glomerata* -levästä löytyi runsaasti myös rasvahappoja C16:1 ja C18:1n9c. Punalevästä *C. tenuicorne* löytyi suuria määriä C16:1 rasvahappoa sekä C20:5n3 rasvahappoa, joka on tyypillistä punaleville (Khotimchenko ym. 2002).

4.5 Makrolevien rasvahappojen pääkomponenttianalyysi

Makrolevien rasvahappoja tarkasteltiin pääkomponenttianalyysin avulla siten, että analyysissä oli mukana 29 muuttujaa eli 29 rasvahappoa. Makrolevien rasvahappoja voitiin tarkastella pääkomponenttianalyysillä, koska KMO-suure (Kaiser-Meyer-Olkin) arvo oli 0,577 ja Bartlettin testin $p < 0,001$. Rasvahappojen välisiä eroja tarkasteltiin kovarianssin eli muuttujien yhteistä vaihtelua mittaavan testin avulla, koska haluttiin painottaa enemmän korkeapitoisempia rasvahappoja kuin matalapitoisempia rasvahappoja. Pääkomponenttianalyysistä löytyi kaksi pääkomponenttia rasvahappojen vaihtelulle, josta ensimmäinen pääkomponentti selitti 80,5% muuttujien vaihtelusta ja toinen pääkomponentti 16,2% vaihtelusta (Kuva 11). Pääkomponenttiin 1 vaikuttivat eniten rasvahapot C14:0, C16:1, C17:0, C18:0, C18:1n9c, C20:4n6 ja C20:5n3 (Kuva 11). Pääkomponentti 2 eniten vaikuttaneet rasvahapot olivat C18:2n6c, C18:3n6, C18:3n3 ja C20:3n3 (Kuva 11).

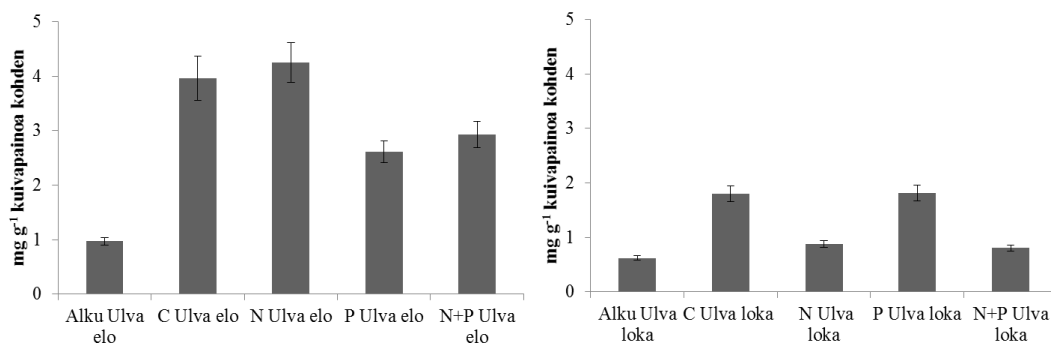


Kuva 11. Makrolevien rasvahappojen pääkomponenttikuvaaja. Aineisto normalisoitu. PK= pääkomponentti

4.6 *Ulva intestinalis* neutraalilipidit

U. intestinalis -levän neutraalilipidifraktion rasvahappomäärät vaihtelivat eri käsittelyiden välillä, mutta eivät merkitsevästi (Kaksisuuntainen varianssianalyysi: $F_{4,8}=2,509$; $p=0,125$) (Kuva 12) (Taulukko 4). Alkutilanteen neutraalilipidifraktion rasvahappomäärät erosivat hieman muiden käsittelyiden neutraalilipidifraktion rasvahappomääristä. Elokuun ja lokakuun *U. intestinalis* -levien neutraalilipidifraktion rasvahappomäärät erosivat toisistaan merkitsevästi (Kaksisuuntainen varianssianalyysi: $F_{1,8}=15,718$; $p=0,004$). Käsittelyillä ja *U. intestinalis* -levän eri näytteenottoajoilla ei ollut yhteisvaikutusta neutraalilipidifraktion rasvahappomäärään (Kaksisuuntainen varianssianalyysi: $F_{4,8}=1,416$; $p=0,312$). Elokuussa *U. intestinalis* -levän neutraalilipidifraktion rasvahappomäärät vaihtelivat välillä 1,0–4,2 mg g⁻¹ kuivapainoa kohden. Elokuussa suurimmat neutraalilipidifraktion rasvahappomäärät olivat kontrolli- (C) ja typpilisäyskäsittelyissä (N), kun taas lokakuussa suurimmat neutraalilipidifraktion rasvahappomäärät mitattiin kontrolli- (C) ja fosforilisäyskäsittelyistä (P) (Kuva 12). Lokakuun *U. intestinalis* -levän neutraalilipidifraktion rasvahappomäärät olivat huomattavasti pienemmät kuin elokuun määrät (Kuva 12). Lokakuun *U. intestinalis* -levän neutraalilipidifraktion

rasvahappomäärät vaihtelivat välillä 0,6-1,8 mg g⁻¹ kuivapainoa kohden. *U. intestinalis* -levien neutraalilipidiosioiden rasvahappojen osuus kokonaislipideistä oli elokuussa 3,1% ja lokakuussa 2,8%.



Kuva 12. *Ulva intestinalis* -levien neutraalilipidifraktion rasvahappomäärät mg g⁻¹ kuivapainoa kohden ja keskihajonnat.

U. intestinalis -levien elokuun ja lokakuun neutraalilipidifraktion rasvahappokoostumukset eivät eronneet toisistaan (Taulukko 6). Molemmissa kokeissa *U. intestinalis* -levillä oli saman verran tyydyttyneitä, kertatyydyttymättömiä ja monityydyttymättömiä rasvahappoja. Elokuun ja lokakuun *U. intestinalis* -levien neutraalilipidifraktion omega-6/omega-3 suhde oli alle 1 (Taulukko 6).

Molemmilla *U. intestinalis* -viherlevillä rasvahappoa C16:0 oli eniten (Taulukko 6). Molemmilta löytyi myös suuria määriä C18:2n6 ja C18:3n3 rasvahappoja.

Elokuun ja lokakuun *U. intestinalis* -levien neutraalilipidifraktion rasvahappokoostumukset erosivat hieman *U. intestinalis* -levien kokonaislipidien rasvahappokoostumuksista. Neutraalilipidifraktion rasvahappokoostumuksessa kertatyydyttymättömien ja monityydyttymättömien rasvahappojen osuus oli suurempi kuin *U. intestinalis* -levien kokonaislipidien rasvahappokoostumuksessa, kun taas tyydyttyneiden rasvahappojen osuus oli pienempi neutraalilipidifraktion rasvahappokoostumuksessa.

Taulukko 6. Elokuun ja lokakuun *Ulva intestinalis* -viherlevien neutraalilipidien rasvahappokoostumus prosenttiosuuksina neutraalilipideistä sekä keskihajonnat. SFA= tyydyttyneet rasvahapot, MUFA= kertatyydyttymättömät rasvahapot ja PUFA= monityyydyttymättömät rasvahapot, - = rasvahappoa ei löytynyt näytteestä, min = rasvahapon osuus alle 0,1%.

Rasvahappo	<i>Ulva intestinalis</i> elokuu	<i>Ulva intestinalis</i> lokakuu
C4:0	-	-
C6:0	-	-
C8:0	min	min
C10:0	-	min
C11:0	-	-
C12:0	min	min
C13:0	min	min
C14:0	1,1±0,7	0,6±0,8
C15:0	0,2±0,1	0,2±0,1
C16:0	39,5±4,3	37,0±3,9
C17:0	0,1±0,1	0,2±0,1
C18:0	2,7±2,7	5,0±2,5
C20:0	0,3±0,3	0,7±0,3
C21:0	0,1±0,1	0,1±0,0
C22:0	0,8±1,3	1,2±0,5
C23:0	min	min
C24:0	0,2±0,2	0,3±0,2
Yht. SFA	45,0±9,0	45,3±8,5
C14:1	-	min
C15:1	0,1±0,1	min
C16:1	4,3±5,0	2,2±0,8
C17:1	min	0,1±0,5
C18:1N9t	-	-
C18:1N9c	2,4±1,0	3,8±3,0
C20:1N9	0,2±0,0	0,2±0,1
C22:1N9	0,2±0,3	0,6±0,6
C24:1N9	-	min
Yht. MUFA	7,2±2,4	7,1±1,8
C18:2N6t	-	-
C18:2N6c	20,3±6,0	18,9±4,3
C18:3N6	0,3±0,1	0,6±0,1
C18:3N3	23,7±3,7	24,1±3,5
C20:2	0,1±0,0	0,1±0,0
C20:3N6	0,3±0,1	0,3±0,1
C20:4N6	0,7±0,3	0,9±0,3
C20:3N3	0,2±0,0	0,1±0,0
C20:5N3	2,0±1,1	2,6±1,1
C22:2	-	-
C22:6n3	0,1±0,3	0,2±0,1
Yht. PUFA	47,8±8,3	47,7±8,2
Yht. of n-3	26,0	27,0
Yht. of n-6	21,7	20,7
Suhde n-6/n-3	0,83	0,77

5. Tulosten tarkastelu

5.1 Akvaariokokeen aikana havaitut muutokset

Makrolevien väri muuttui eri käsittelyissä elokuun ja lokakuun akvaariokokeiden aikana. Käsittelyiden välinen väri vaihtelu oli erityisen selvä *U. intestinalis* -viherlevän altaissa. Kontrolli- ja fosforilisäyskäsittelyissä *U. intestinalis* -levän näytteet haalistuivat valkeiksi, koska ne elivät typpirajoitteisissa olosuhteissa, ja mahdollisesti eivät pystyneet tuottamaan klorofylliä typpivajeen takia (Robertson-Andersson ym. 2009). Typen- ja fosforin yhteisvaikutuksesta leväyksilöiden väri muuttui tumman vihreäksi, koska käsittelyiden makrolevillä oli ylitarjontaa ravinteista. Robertson-Andersson (2004) havaitsi, että *Ulva lactuca* -levän sekovarsi muutti väriä kun levää siirrettiin ravinneköyhistä olosuhteista ravinnekylläisiin olosuhteisiin ja samoin toisinpäin.

Elokuun ja lokakuun akvaariokokeiden aikana eri käsittelyiden sisällä havaittiin ravinnepitoisuuksien muutoksia. Kontrollikäsittelyssä kaikki ravinteet käytettiin saman tien hyödyksi, mutta typpilisäys- ja fosforilisäyskäsittelyissä lisätyn ravinteen pitoisuus kasvoi kokeen aikana, toisesta ravinteesta tuli levien kasvua rajoittava tekijä. Esimerkiksi typpilisäyskäsittelyissä nitraatin pitoisuus kasvoi suureksi, koska makrolevät eivät pystyneet käyttämään liiallisia ravinne-määriä hyödykseen. Typen ja fosforin yhteiskäsittelyissä makrolevät käyttivät kaikki ravinteet tehokkaasti hyödykseen, mutta nitraatti oli enemmän makrolevien kasvua rajoittava tekijä.

5.2 Makrolevien kokonaislipidit

Makrolevien kokonaislipidimäärät erosivat muiden tutkimuksien makrolevien mitatuista kokonaislipidimääristä. Tutkimuksemme makrolevien kokonaislipidimäärät olivat suuremmat kuin muilta leviltä mitatut. Esimerkiksi Fleurence ym. (1994) mittasivat *Ulva intestinalis* -levälle 18,5 mg g⁻¹ kuivapainoa kohden kokonaislipidejä ja Nelson ym. (2002) *Ulva lobata* -levälle 20,1–29,1 mg g⁻¹ kuivapainoa kokonaislipidejä. Fleurence ym. (1994) tutkivat tosin *U. intestinalis* -levän kokonaislipidimäärää kevään aikana luonnosta otetuista näytteistä Iso-Britannian rannikolta. Nelson ym. (2002) tarkastelivat viherlevän kokonaislipidimäärää vuodenajoittain Kalifornian rannikolta kerätystä näytteistä. Khotimchenko ym. (2002) mittasivat taas *Ulva compressa* -levän kokonaislipidimääräksi 52,2 mg g⁻¹ kuivapainoa. Tutkimuksen makrolevät oli kerätty marraskuussa Kalifornian rannikolta.

Tutkimuksemme makrolevien kokonaislipidimäärät vastasivat enemmän Goschin ym. (2012) tutkimuksessa saatuja tuloksia. Gosch ym. (2012) tutkimuksessa tutkittavien viherlevien kokonaislipidimäärät vaihtelivat 98,7–130,4 mg g⁻¹ kuivapainoa. *Cladophora patentiramea* -viherlevän kokonaislipidimääräksi saatiin 98,7 mg g⁻¹ kuivapainoa. Tutkimuksen makrolevät oli kerätty Australian koilliselta rannikolta.

Tässä tutkimuksessa erot makrolevien kokonaislipidimäärissä selittyvät osittain lajien taksonomialla. Käytössä oli kaksi viherlevälajia sekä yksi punalevälaji, joiden lipidimäärää ei ole ennen tutkittu lajitasolla. Tutkimuksessa ei havaittu Goschin ym. (2012) ja Nelsonin ym. (2002) havaitsemaa ilmiötä, jonka mukaan viherlevät sisältäisivät enemmän lipidejä kuin punalevät. Lokakuun kokeessa *U. intestinalis* sisälsi vähemmän lipidejä kuin *C. tenuicorne*.

Lokakuun *U. intestinalis* -levän kokonaislipidimäärät erosivat kaikista muista tutkimuksemme makrolevien kokonaislipidimääristä. Lokakuussa *U. intestinalis* -levällä oli matalin lipidimäärä verrattuna muihin viherleviin sekä *C. tenuicorne* -punalevään. Lokakuun *U. intestinalis* -levän kokonaislipidimäärät muistuttivat osittain Khotimchenko ym. (2002) mittaamia viherlevien kokonaislipidimääriä. Tämän tutkimuksen *U. intestinalis* -levän kokonaislipidimäärät olivat hieman suuremmat kuin mitä Khotimchenko ym. (2002) mittasivat *Ulva lactuca* -levällä, mikä voi selittyä viherlevälajien eri lipidimääristä. Lokakuussa mitatut alhaiset *U. intestinalis* -levän kokonaislipidimäärät voivat johtua siitä, että vuodenaikaan nähden *U. intestinalis* ei enää ole dominoiva litoraalityöhykkeessä vaan *U. intestinalis* -levän sekovarret ovat alkaneet jo vanhentua ja kuolla. Punalevä *C. tenuicorne* aloittaa syksyllä litoraalityöhykkeen valloituksen, joten *C. tenuicorne* -punalevän sekovarret ovat voineet olla paremmassa kunnossa kuin *U. intestinalis* -levän yksilöt.

Makrolevien erilaiset kokonaislipidimäärät johtuvat tutkittavien lajien erilaisesta kemiallisesta koostumuksesta, vuodenaikaisvaihtelusta sekä ympäristötekijöiden muutoksista. Esimerkiksi makrolevien kokonaislipidimäärään vaikuttaa se, minä vuodenaikana levät on kerätty ja analysoitu (Nelson ym. 2002). Talvella makrolevien lipidimäärät ovat suurempia kuin kesällä. Makrolevien kasvatustiheys voi vaikuttaa myös lipidimäärään, mutta enemmän siihen vaikuttaa makrolevien perustuotanto. Perustuotannon lisääntyminen parantaa kokonaislipidien, kokonaisrasvahappojen ja monitydyttymättömien rasvahappojen tuotantoa (Magnusson ym. 2014). Magnusson ym. (2014) havaitsivat, ettei kasvatustiheydellä ollut vaikutusta *Derbesia tenuissima* -levän kokonaislipidimäärään. Tutkimuksemme korkeat kokonaislipidimäärät voivat johtua

makrolevien alhaisesta kasvatustiheydestä, mutta perustuotannon lisääntymisen vaikutusta makrolevien kokonaislipidimäärään on vaikea todeta.

Tässä tutkimuksessa havaittiin, että makrolevien kokonaislipidimäärät eivät olleet suurimmat niukkaravinteisissa ja ankarimmissa oloissa, kuten Hun ym. (2008) ja Rodolfin ym. (2008) tutkimuksissa. Elokuun ja lokakuun *U. intestinalis* -levien kokonaislipidimäärien suurimmat mitatut arvot vaihtelivat. Elokuussa *U. intestinalis* -levän suurimmat kokonaislipidimäärät mitattiin kontrollikäsittelystä, kun taas lokakuussa *U. intestinalis* -levän suurimmat arvot mitattiin typpi- ja fosforilisäyskäsittelystä. *C. glomerata* ja *C. tenuicorne* -levillä suurimmat kokonaislipidimäärät mitattiin typpilisäyskäsittelyistä. Tutkimuksessa veteen lisättävät ravinnelisykset aiheuttivat kontrolli- ja fosforilisäyskäsittelyissä makroleville typen puutostilan, koska kyseisissä käsittelyissä makrolevien väri muuttui kokeen loppua kohden. Makrolevät eivät pystyneet tuottamaan klorofylliä typen puuttuessa, jolloin ne alkoivat haalistua (Robertson-Andersson ym. 2009). Makrolevien kemiallinen koostumus todennäköisesti muuttuu hitaammin kuin mikrolevien vaihtuvissa olosuhteissa, mutta aiempien tutkimuksien mukaan litoraalivyöhykkeen levät ovat sopeutuneet nopeisiin ympäristötekijöiden muutoksiin, kuten lämpötilan ja valon muutoksiin (Schmid ym. 2014).

Altaiden erilaiset ravinnekäsittelyt eivät vaikuttaneet makrolevien kokonaislipidimäärään kasvuun tai pienenemiseen, vaan elokuun ja lokakuun akvaariokokeiden altaiden erilainen lämpötila saattoi olla tärkeämpi makrolevien kokonaislipidimäärään vaikuttava tekijä (Floreto ym. 1993; Nelson ym. 2002). Veden lämpötila vaikuttaa makrolevien lipidien koostumukseen muuttamalla solukalvojen joustavuutta sekä tyydyttyneiden ja tyydyttymättömien rasvahappojen suhdetta (Colombo ym. 2006).

Näytteenottohetken muut ympäristötekijät ovat vaikuttaneet makrolevien kemialliseen koostumukseen, kuten niiden lipidimäärään. Rodolfi ym. (2008) esittivät, että makroleviä tulisi ensin kasvattaa otollisissa oloissa perustuotannon kasvamiseksi, ja sitten siirtyä niukkaravinteisiin olosuhteisiin lipidisynteesiä varten. Stephenson ym. (2010) havaitsivat, että levien pitäisi antaa kuluttaa typpivarastonsa loppuun ilman ravinnelisyksiä korkean lipidimäärän tuotantoa varten. Griffiths ym. (2014) esittivät, että levien kasvatuksessa pitäisi hyödyntää sekä perustuotannon että lipidimäärän kasvua vaiheittaisissa kasvatuskokeissa. Leviä pitäisi ensin kasvattaa typpikylläisissä oloissa perustuotannon kasvattamiseksi, ja sitten muuttaa levien olosuhteet niukkaravinteisiksi lipidimäärän lisäämiseksi. Levät voisi myös kasvattaa ensin kasvattamalla niiden lipidimäärää niukkaravinteisissä oloissa, ja sitten siirtyä perustuotannon kasvattamiseen (Griffiths ym.

2014). Griffiths ym. (2014) totesivat, että kaksivaiheinen levien kasvattaminen olisi otollinen, koska perustuotannon ja lipidimäärän kasvattamiselle tarvitaan erilaiset ravinneolosuhteet.

5.3 Makrolevien rasvahappokoostumus

Makrolevien kokonaisrasvahappomäärät olivat pienemmät kuin Gosch ym. (2012) mittasivat, mutta suuremmat kuin Fleurencen ym. (1994) mitaamat kokonaisrasvahappomäärät. Gosch ym. (2012) mittasivat viherlevien kokonaisrasvahappomääräksi 27,6–39,6 mg g⁻¹ kuivapainoa kohden, kun taas Fleurence ym. (1994) tulokset olivat 7,1 mg g⁻¹ kuivapainoa kohden. Tutkimuksemme makrolevien kokonaisrasvahappomäärät olivat myös pienemmät kuin Nelson ym. (2002) mittasivat *Ulva lobata* -viherlevältä. Punalevän *C. tenuicorne* kokonaisrasvahappomäärät olivat taas suuremmat kuin Nelson ym. (2002) mitaaman *Chondracanthus canaliculatus* -punalevän. Tässä tutkimuksessa makrolevien kokonaisrasvahappomäärä oli enintään 9 mg g⁻¹ kuivapainoa.

Se minkälaista rasvahappojen metyyliestereiden sekoitusta (FAME -mix) on käyttänyt tutkimuksessa, vaikuttaa siihen, mitä rasvahappoja on mahdollista tunnistaa. Käyttämämme rasvahappojen metyyliestereiden sekoituksen sisältö oli erilainen kuin mitä Khotimchenko ym. (2002) ja Schmid ym. (2014) ovat käyttäneet.

Viherlevien *U. intestinalis* ja *C. glomerata* kokonaislipidien rasvahappokoostumus oli samankaltainen kuin muissa tutkimuksissa (Khotimchenko ym. 2002; Schmid ym. 2014), vaikka tiettyjä eroavuuksia löytyi. Viherlevät sisälsivät eniten tyydyttyneitä rasvahappoja (40–50% kokonaislipideistä), joiden yleisin rasvahappo oli C16:0 (32–46% kokonaislipideistä) kuten myös Fleurence ym. (1994), Schmid ym. (2012) ja van Ginneken ym. (2011) ovat mitanneet. *U. intestinalis* -levän elokuun ja lokakuun näytteissä monityydyttymättömiä rasvahappoja oli enemmän kuin kertatyydyttymättömiä rasvahappoja toisin kuin *C. glomerata* -levällä. Pereira ym. (2012) mittasivat *Cladophora albida* -levällä hieman suuremman osuuden kertatyydyttymättömiä kuin monityydyttymättömiä rasvahappoja.

U. intestinalis -levän elokuun ja lokakuun rasvahappokoostumuksessa suurimpia osuuksia monityydyttymättömiä rasvahappoja oli C18:2n6c ja C18:3n3 -ryhmissä kuten myös Schmid ym. (2012) tutkimassa *U. lactuca* -levässä. *C. glomerata* -levällä

kertatyydyttymättömiä rasvahappoja oli eniten C16:1 ja C18:1n9c -ryhmissä. Pereira ym. (2012) mittasivat korkeita pitoisuuksia C18:1n9c rasvahapon ryhmässä *Cladophora albida* -levälle, mutta monityydyttymättömien rasvahappojen joukossa Pereira ym. (2012) mittasivat enemmän C18:2n6 rasvahappoa *Cladophora albida* -levällä kuin tutkimuksen *C. glomerata* -levällä.

C. tenuicorne -punalevällä oli eniten tyydyttyneitä rasvahappoja, samoin kuin viherlevillä, joista suurin osuus oli C16:0 rasvahappoa (Pereira ym. 2012; Schmid ym. 2012). *C. tenuicorne* -levällä oli enemmän kertatyydyttymättömiä kuin monityydyttymättömiä rasvahappoa toisin kuin Schmid ym. (2014) mittaamalla *Ceramium virgatum* -levällä, jolla oli enemmän monityydyttymättömiä kuin kertatyydyttymättömiä rasvahappoja. *C. virgatum* -levän runsain rasvahappo oli C16:0 (46% kokonaisrasvahapoista) (Schmid ym. 2012). *C. tenuicorne* -levältä mitattiin runsaimmaksi osuudeksi kertatyydyttymätön C16:1 rasvahappo, samoin kuin *C. glomerata* -levältä. C20:5n3 mitattiin myös runsaimmaksi monityydyttymättömäksi rasvahapoksi *C. tenuicorne* -levältä, kuten Khotimchenko ym. (2002) ja Schmid ym. (2012) esittävät. Kokeessa olevalta punalevältä ei mitattu suuria määriä C20:4n6 rasvahappoa toisin kuin Khotimchenko ym. (2002) mittasivat.

Elokuun ja lokakuun *U. intestinalis* -levien rasvahappokoostumukset vaihtelivat, mikä voi mahdollisesti olla vuodenaikaisvaihtelua (Nelson ym. 2002). Lokakuussa *U. intestinalis* -levän kerta- ja monityydyttymättömien rasvahappojen osuus nousi hieman, kun taas tyydyttyneiden rasvahappojen osuus pieneni. Elokuussa *U. intestinalis* -levän tyydyttyneiden rasvahappojen osuus oli korkeampi kuin lokakuussa *U. intestinalis* -levällä. Colombo ym. (2006) esittivät tutkimuksessa, että tyydyttymättömien rasvahappojen osuus kasvaa kylmemmissä vesissä. Selityksenä voi olla, että kylmemmissä vesissä monityydyttymättömät rasvahapot pitävät soluelinten kalvot joustavina (Floreto ym. 1993; Schmid ym. 2014).

Makrolevien korkea tyydyttyneiden rasvahappojen osuus kertoo, että makrolevät olivat stressaantuneita, koska stressaavissa olosuhteissa tyydyttyneiden ja kertatyydyttymättömien rasvahappojen osuudet kasvavat (Hu ym. 2008). Stressiolosuhteissa makrolevät tuottavat enemmän neutraaleja lipidejä kuten triasyyliglyseroleja (TAG) kuin kalvolipidejä, eli ne siirtyvät kalvolipidien synteesistä varastolipidien tuottamiseen (Hu ym. 2008).

Tutkimuksemme makrolevien rasvahappojen osuus gravimetrisesti määritetyistä kokonaislipidimäärästä oli pieni, koska tutkittavien makrolevien kokonaislipidifraktioon

on liennut myös pigmenttejä ja lipidirakenteisiin sitoutuneita proteiineja (Fleurence ym. 1994). Alhainen rasvahappojen osuus kokonaislipideistä kertoo, että makrolevien lipidit saattoivat olla poolisia kalvolipidejä kuten glyko- ja fosfolipidejä.

5.4 *Ulva intestinalis* -levän neutraalilipidit

U. intestinalis -levän neutraalilipidifraktion rasvahappomäärät olivat erilaiset elokuun ja lokakuun näytteiden välillä. Lokakuun *U. intestinalis* -levän neutraalilipidifraktion rasvahappoja oli eniten niukkaravinteisissa käsittelyissä juuri oletuksien mukaisesti. *U. intestinalis* -levän alhaiset neutraalilipidifraktion rasvahappomäärät vastaavat sitä, mitä Nelson ym. (2002) mittasivat *U. lobata* -viherlevältä, vaikka lipidiryhmien fraktiointimenetelmä on ollut erilainen. Alhainen neutraalilipidien määrä voi selittyä viherlevien lipidien suuresta poolisten lipidien määrästä, kuten muissa tutkimuksissa on todettu. Fleurence ym. (1994) tutkimuksessa *U. intestinalis* -levän neutraalilipidien osuus rasvahapoista oli 30,3%, mikä on suurempi osuus kuin mitä tutkimuksessani saatiin *U. intestinalis* -levän neutraalilipidien osuudeksi (2-3%). Fleurence ym. (1994) erottivat neutraali-, glyko- ja fosfolipidit pylväskromatografian avulla, joten lipidien erilainen erottelumenetelmä voi osittain selittää eroavuudet tämän tutkimuksen neutraalilipidiosuuksiin. Elokuun ja lokakuun *U. intestinalis* -levien neutraalilipidifraktion rasvahappokoostumukset eivät eroa toisistaan, joten makrolevällä ei ole tapahtunut vuodenaikaista sopeutumista erilaisiin olosuhteisiin.

5.5 Makrolevät biodieselin raaka-aineeksi

Tutkimuksemme makrolevät soveltuvat hyvin biodieselin tuotantoon, koska ne sisälsivät suuren määrän lipidejä sekä tyydyttyneitä rasvahappoja, joita suositaan biopolttoaineiden tuotannossa (Hu ym. 2008). Suuri monityydyttymättömien rasvahappojen osuus tuottaa epästabiileja ja huonolaatuisempia biopolttoaineita (Gosch ym. 2012).

Makrolevien käyttäminen biodieselin raaka-aineena on kuitenkin vielä kaukana teollisuus tuotannosta, koska makrolevien kasvattaminen ja lipidien tuotannon optimointi ovat vielä kehitysvaiheessa. Mikrolevät saattavat olla parempaa raaka-ainetta biodieselin tuotantoon, koska ne sisältävät enemmän lipidejä ja biodieselin tuotanto on suurempi kuin makrolevillä (Afify ym. 2010). Mikroleväsolujen suodattaminen kasvatusvedestä on taas pitkäkestoisempaa kuin makrolevien kerääminen. Makroleviä voisi kerätä rannoilta

biodieselin raaka-aineeksi ja samalla vähentää rihmalevien lisääntymistä. Makrolevien kerääminen rannoilta parantaisi myös veden laatua. Suutari ym. (2015) esittävät, että talvella kerätyt makrolevät soveltuvat parhaiten biodieselin raaka-aineeksi korkean lipidimäärän takia.

Makrolevien lipidimääriä pystyttäisiin kasvattamaan sekoittamalla makrolevälajeja yhteen levämassasekoitukseen, ja samalla biodieselin tuotanto nousisi (Maceiras ym. 2011). Makroleviä voisi käyttää hyväksi myös sekoittamalla niitä biopolttoaineiden raaka-aineisiin. Sarker ym. (2012) havaitsivat, että biokaasun tuotanto lehmien ulosteesta parani, kun sekaan lisättiin *Ulva lactuca* ja *Laminaria digitata* -makroleviä. Biodieselin tuotanto voisi olla suurempaa, jos kasvipööräisten lipidien mukana olisi makrolevien lipidejä. Makrolevien lipidien eristämiseen pitäisi myös kiinnittää huomiota, koska lipidien erilaiset eristystavat voivat vähentää tai kasvattaa lipidimäärää (Jones ym. 2012).

Makrolevät soveltuvat biopolttoainetuotantoa paremmin ihmisravinnoksi tai kalarehuksi, jos ne sisältävät suuria määriä monitydyttymättömiä rasvahappoja. Makrolevien turvallisesta koostumuksesta täytyy olla varma ennen kuin makrolevätuotteita viedään ihmisravinnoksi tai eläinten rehuksi, koska makrolevät saattavat sisältää toksisia aineita tai raskasmetalleja.

6. Yhteenveto

Makrolevien erilaiset kokonaislipidimäärät johtuivat pääasiassa akvaariokokeiden erilämpöisistä altaista. Veden ravinnepitoisuus ei vaikuttanut makrolevien lipidimäärään. Tutkimuksessa ei päästy käsiksi makrolevien lipidien vuodenaikaisvaihteluun, koska lokakuussa *U. intestinalis* ei todennäköisesti ollut elinvoimainen. *U. intestinalis* -levän lipidimäärän vuodenaikaista vaihtelua on vaikea verrata, koska elokuussa ja lokakuussa levät ovat kasvaneet erilaisissa fysiologisissa oloissa. Makrolevien kokonaislipidimäärät erosivat toisistaan lokakuun *U. intestinalis* -levän alhaisten kokonaislipidimäärien takia. Makrolevät voisivat olla sovelias raaka-aine biodieselin tuotantoon korkean kokonaislipidimäärän ja tyydyttyneiden rasvahappojen osuuden takia. Todennäköisesti makrolevät pystyisivät tuottamaan tässä kokeessa havaittua runsaammin lipidejä niukkaravinteisissa olosuhteissa, jos makrolevien annettaisiin sopeutua ennen koetta uusiin olosuhteisiin.

Tutkimuksessa käytetyt makrolevälajit ovat yleisiä levälajeja litoraalivyöhykkeessä ja erityisesti *C. glomerata* hyötyy rehevöitymisestä. Mielenkiintoista olisi nähdä, miten rakkolevän (*Fucus vesiculosus*) lipidimäärät vaihtelevat veden eri ravinnepitoisuuksissa. Makrolevien lipidimäärän vuodenaikaista vaihtelua pitäisi tutkia, jos halutaan optimoida suurimman lipidimäärän ajankohta.

Kiitokset

Haluan kiittää ensimmäisenä ohjaajiani Milla Suutaria ja Elina Leskistä asiantuntevasta, kannustavasta, innostavasta ja kärsivällisestä ohjauksesta. Erikoiskiitos Milla Suutarille opastuksesta akvaariokokeiden teon aikana ja makrolevien lipidien käsittelyjen kanssa. Kiitos myös Walter ja Andre de Nottbeck säätiölle heidän antamastaan apurahasta. Tvärminnen eläintieteellisen aseman henkilökuntaa haluan myös kiittää akvaariohuoneen käytöstä ja laboratoriohenkilökuntaa ravinnenäytteiden analysoinnista. Haluan myös kiittää Marika Tikkaa lipidien eristyksen asiantuntemuksesta ja opastuksesta kaasukromatografi-massaspektrometri laitteen toimintaan. Kiitos myös perheelleni, joka on kannustanut minua koko opiskeluajan ja kuunnellut makroleväjuttujani. Matille iso kiitos kaikesta!

Kirjallisuus

- Abdallah, M.A.M. 2012: Seaweeds, food, and industrial products and nutrition. - In V.H. Pomin, *Seaweed* (p. 99-118). New York: Nova Science Publishers.
- Afify, A.M.M.R., Shalaby, E.A. & Shanab, S.M.M. 2010: Enhancement of biodiesel production from different species of algae. – *Grasas y Aceites*. 61:416-422.
- Arsenault, J.C. 2012: Beginner's guide to SPE solid-phase extraction. Waters Corporation, Milford, USA.
- Becker, E.W. 2004: Microalgae in human and animal nutrition. In A. Richmond, *Handbook of microalgal culture* (p. 312-351). Blackwell, Oxford.
- Becker, E.W. 2007: Micro-algae as a source of protein. – *Biotechnology Advances*. 25: 207-210.

- Bertness, M.D., Gaines, S.D. & Hay, M.E. 2001: Marine Community Ecology. Sinauer Associates, Sunderland, USA.
- Busi, M.V., Barchiesi, J., Martin, M. & Gomez-Sasati, D.F. 2013: Starch metabolism in green algae. – *Starch/Stärke*. 66: 28-40.
- Cabanelas, I.T.D., Arbib, Z., Chinalia, F.A., Souza C.O., Perales, J.A., Almeida, P.F., Druzian J.I. & Nascimento I.A. 2013: From waste to energy: Microalgae production in wastewater and glycerol. – *Applied Energy*. 109: 283-290.
- Chia, M.A., Lombardi, A.T., Melão, M.G.G. & Parrish, C.C. 2013: Lipid composition of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae) as a function of different cadmium and phosphate concentrations. – *Aquatic Toxicology*. 128-129: 171-182.
- Chisti, Y. 2007: Biodiesel from microalgae. – *Biotechnology Advances*. 25: 294-306.
- Christie, W.W. & Han, X. 2010: LIPID ANALYSIS: Isolation, Separation, Identification and Lipidomic Analysis. 4 th ed., The Oily Press, Bridgwater, Somerset, UK.
- Colombo, M.L., Risé, P., Giavarini, F., de Angelis, L., Galli, C. & Bolis, C.L. 2006: Marine macroalgae as sources of polyunsaturated fatty acids. – *Plant Foods for Human Nutrition*. 61: 67-72.
- Converti, A., Casazza, A.A., Ortiz, E.Y., Perego, P. & del Borghi, M. 2009: Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. – *Chemical Engineering and Processing*. 48: 1146-1151.
- Dragone, G., Fernandes, B., Vcente, A.A. & Teixeira, J.A. 2010: Third generation biofuels from microalgae. – *Current Research, Technology and Education topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. 2: 1355-1366.
- Duggins, D.O. 1980: Kelp dominated communities: experimental studies on the relationship between sea urchins, their predators, and their algal resources. Väitöskirja, University of Washington, Seattle; 134 pp.
- Eriksson, B.K. & Bergström, L. 2005: Local distribution patters of macroalgae in relation to environmental variables in the northern Baltic Proper. – *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 62: 109-117.

- Fleurence, J., Gutbier, G., Mabeau, S. & Leray, C. 1994: Fatty acids from 11 marine macroalgae of the French Brittany coast. – *Journal of Applied Phycology*. 6: 527-532.
- Fleurence, J. 1999: Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. – *Trends in Food Science & Technology*. 10: 25-28.
- Floreto, E.A.T., Hirata, H., Ando, S. & Yamasaki, S. 1993: Effects of temperature, light intensity, salinity and source of nitrogen on the growth and fatty acid composition of *Ulva pertusa* Kfellman (Chlorophyta). – *Botanica Marina*. 36: 149-158.
- Floreto, E.A.T. & Teshima, S. 1998: The fatty acid composition of seaweeds exposed to different levels of light intensity and salinity. – *Botanica Marina*. 41: 467-481.
- Galloway, A.W.E., Britton-Simmons, K.H., Duggins, D.O., Gabrielson, P.W. & Brett, M.T. 2012: Fatty acid signatures differentiate marine macrophytes at ordinal and family ranks. – *J. Phycol.* 48: 956-965.
- Goncharova, S.N., Konstetsky, E.Ya. & Sanima N.M. 2004: The effect of seasonal shifts in temperature on the lipid composition of marine macrophytes. – *Russian Journal of Plant Physiology*. 51: 169-175.
- Gosch, B.J., Magnusson, M., Paul, N.A. & de Nys, R. 2012: Total lipid and fatty acid composition of seaweeds for the selection of species for oil-based biofuel and bioproducts. – *GCB Bioenergy*. 4: 919-930.
- Graeve, M., Kattner, G., Wiencke, C. & Karsten U. 2002: Fatty acid composition of Arctic and Antarctic macroalgae: indicator of phylogenetic and trophic relationships. – *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 231: 67-74.
- Griffiths, M.J., van Hille, R.P. & Harrison, S.T.L. 2014: The effect of degree and timing of nitrogen limitation on lipid productivity in *Chlorella vulgaris*. – *Appl. Microtechnol. Biotechnol.* 98: 6147-6159.
- Hawkins, S.J. & Hartnoll R.G. 1983: Grazing of intertidal algae by marine invertebrates. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 21: 195-282.
- Hawkins, S.J., Hartnoll, R.G., Kain, J.M. & Norton, T.A. 1992: Plant animal interaction on hard substrata in the North-east Atlantic. In: John, D.M., Hawkins, S.J., Price, J.H.

- (ed.) Plant-animal interactions in the marine benthos. Systematics Association Spec. Vol. 46. Clarendon Press, Oxford, p. 1-32.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M. & Darzins, A. 2008: Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. – *the Plant Journal*. 54: 621-639.
- Jaarinen, S. & Niiranen, J. 2005: Laboratorion analyysiteknikka. 5 th ed. Edita. 223 p.
- Jones, J., Manning, S., Montoya, M., Keller, K. & Poenie, M. 2012: Extraction of algal lipids and their analysis by HPLC and mass spectrometry. – *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 89: 1371-1381.
- Kautsky, H. 1993: Quantitative distribution of sublittoral plant and animal communities along the Baltic Sea gradient. In: Elftheriou, A. (ed.), *Biology and Ecology of Shallow Coastal Waters*. Olsen and Olsen, Fredensborg, pp. 22-30.
- Kautsky, H., Martin, G., Mäkinen, A., Borgiel, M., Vahteri, P. & Rissanen, J. 1999: Structure of phytobenthic and associated animal communities in the Gulf of Riga. – *Hydrobiologia*. 393: 191-200.
- Khotimchenko, S.V., Vaskovsky, V.E. & Titlyanova, T.V. 2002: Fatty acids of marine algae from the pacific coast of North California. – *Botanica Marina*. 45: 17-22
- Khotimchenko, S.V. & Yakovleva, I.M. 2004: Effect of irradiance on lipids of the green alga *Ulva fenestrata* Postels *et* Ruprecht. – *Botanica Marina*. 47: 395-401.
- Kiirikki, M. 1996: Mechanisms affecting macroalgal zonation in the northern Baltic Sea. – *Eur. J. Phycol.* 31: 225-232.
- Kovač, D.J., Simeunović, J.B., Babić, O.B., Mišan, A.Č. & Milovanović, I.Lj. 2013: Algae in food and feed. – *Food and Feed Research*. 40: 21-31.
- Kumar, I.J.N., Kumar, R.N., Manmeet, K., Bora, A. & Sudeshnachakraborty. 2010: Variation of biochemical composition of eighteen marine macroalgae collected from Okha coast, Gulf of Kutch, India. – *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*. 9: 404-410.

- Liang, Y., Sarkany, N. & Cui, Y. 2009: Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. – *Biotechnol. Lett.* 31: 1043-1049.
- Lüning, K. 1990: Seaweeds: Their environment, Biogeography, and Ecophysiology. John Wiley & Sons, Inc., New York, USA.
- Lv, J.M., Cheng, L.H., Xu, X.H., Zhang, L. & Chen H.L. 2010: Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. – *Bioresource Technology*. 101: 6797-6804.
- Maceiras, R., Rodríguez, M., Cancela, A., Urréjola, S. & Sánchez, A. 2011: Macroalgae: Raw material for biodiesel production. – *Applied Energy*. 88: 3318-3323.
- Magnusson, M., Mata, L., de Nys, R. & Paul, N.A. 2014: Biomass, lipid and fatty acid production in large-scale cultures of the marine macroalga *Desbesia tenuissima* (Chlorophyta). – *Mar. Biotechnol.* 16: 456-464.
- Mata, T.M., Martins, A.A. & Caetano, N.S. 2010: Microalgae for biodiesel production and other applications. - *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 14: 217-232.
- Metting, F.B. 1996: Biodiversity and application of microalgae. - *J. Ind. Microbiol.* 17: 477-489.
- Mohamed, S., Matanjun, P., Hashim, S.N., Rahman, H.A. & Mustapha, N.M. 2012: Edible seaweeds: A functional food with organ protective and other therapeutic applications. - In V.H. Pomin, *Seaweed* (p. 67-98). New York: Nova Science Publishers.
- Mäkinen, A., Tallberg, P., Anttila, S., Boström, C., Boström, M., Bäck, S., Ekebom, J., Flinkman, J., Henricson, C., Koistinen, M., Korpinen, P., Kotilainen, A., Laine, A., Lax, H.-G., Leskinen, E., Munsterhjelm, R., Norkko, A., Nyman, M., O'Brien, K., Oulasvirta, P., Ruuskanen, A., Vahteri, P. & Westerbom, M. 2008: Itämeren vedenalaiset luontotyypit. Julk.: Raunio, A. Schulman, A. & Kontula, T. (toim.). 2008. Suomen luontotyyppien uhanalaisuus – Osa II: Luontotyyppien kuvaukset. Suomen ympäristökeskus, Helsinki. Suomen ympäristö 8/2008. 572 s.
- Nelson, D.L. & Cox, M.M. 2008: Lehninger Principles of biochemistry. 5th ed. Worth Publishers. New York.

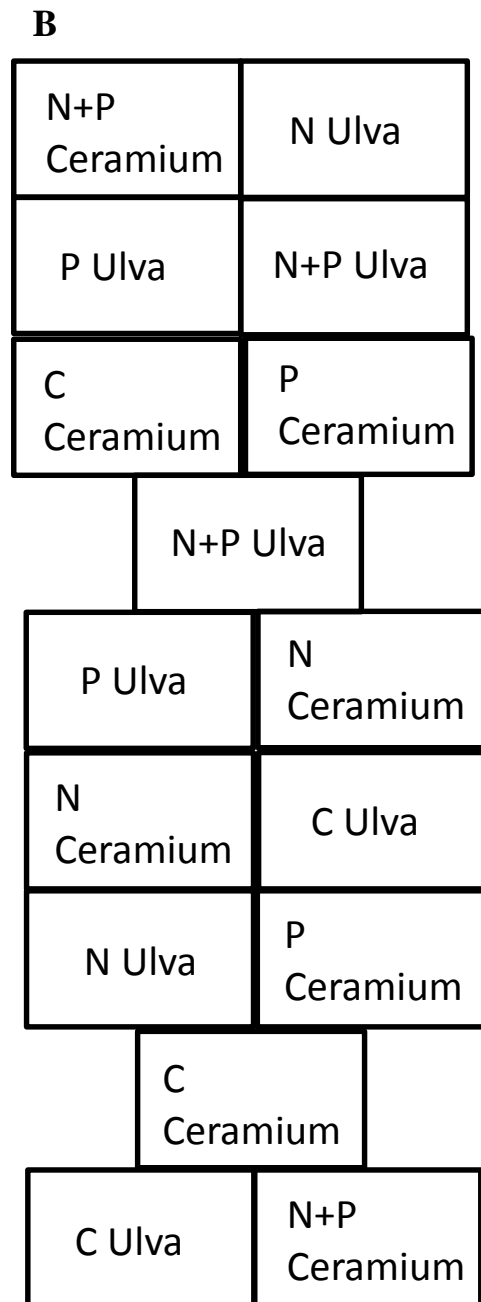
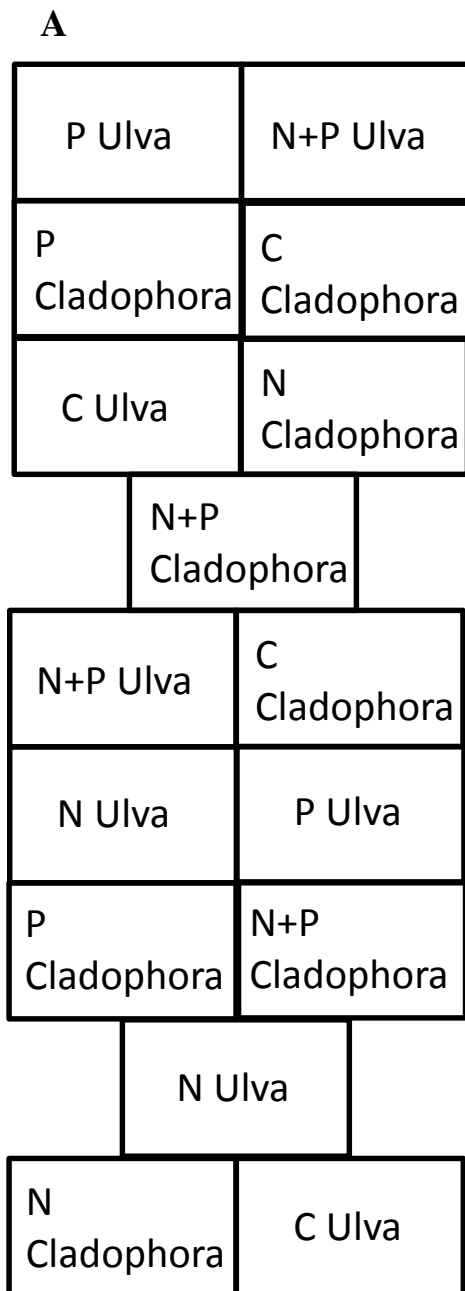
- Nelson, M.M., Phleger, C.F. & Nichols, P.D. 2002: Seasonal lipid composition in macroalgae of the northeastern Pacific Ocean. - *Bot. Mar.* 45: 58-65.
- Nigam, P.S. & Singh A. 2011: Production of liquid biofuels from renewable resources. – *Progress in Energy and Combustion Science.* 37: 52-68.
- Pereira, L. 2012: A review of the nutrient composition of selected edible seaweeds. – In V.H. Pomin, *Seaweed* (p. 15-49). New York: Nova Science Publishers.
- Pereira, H., Barreira, L., Figueiredo, F., Custódio, L., Vizetti-Duarte, C., Polo, C., Rešek, E., Engelen, A. & Varela, J. 2012: Polyunsaturated fatty acids of marine macroalgae: Potential for nutritional and pharmaceutical applications. – *Mar. Drugs.* 10: 1920-1935.
- Renewable Fuels Association. 2014. World fuel ethanol production. Viitattu 12.12.2014. <http://ethanolrfa.org/pages/World-Fuel-Ethanol-Production>
- Robertson-Andersson, D.V. 2004: The cultivation of *Ulva lactuca* (Chlorophyta) in a integrated aquaculture system, for the production of abalone feed and the bioremediation of aquaculture effluent. Pro Gradu. University of Cape Town, South Africa.
- Robertson-Andersson, D.V., Wilson, D.T., Bolton, J.J., Anderson, R.J. & Maneveldt, G.W. 2009: Rapid assessment of tissue nitrogen in cultivated *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta) and *Ulva lactuca* (Chlorophyta). – *African Journal of Aquatic Science.* 34: 169-172.
- Rodolfi, L., Zittelli, G.C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G. & Tredici, M.R. 2008: Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. – *Biotechnology and Bioengineering.* 102: 100-112.
- Sarker, S., Bruhn, A., Ward, A.J. & Møller, H.B. 2012: Biofuel from anaerobic co-digestion of the macro-algae *Ulva lactuca* and *Laminaria digitata*. – *Renewable Energy and Energy Efficiency.* 86-90.
- Schmid, M., Guihéneuf, F. & Stengel, D.B. 2014: Fatty acid contents and profiles of 16 macroalgae collected from the Irish Coast at two seasons. – *J Appl. Phycol.* 26: 451-463.

- Schonbeck, M.W. & Norton, T.A. 1980: Factors controlling the lower limits of fucoid algae on the shore. – *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 43: 131-150.
- Solovchenko, A.E., Khozin-Goldberg, I., Didi-Cohen, S., Cohen, Z. & Merzlyak, M.N. 2008: Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acid and arachidonic acid in the green microalgae *Parietochloris incise*. – *J. Appl. Phycol.* 20: 245-251.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. & Isambert, A. 2006: Commercial applications of microalgae. – *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 101: 87-96.
- Stengel, D.B., Connan, S. & Popper, Z.A. 2011: Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial. – *Biotech. Adv.* 29: 483-501.
- Stephenson, A.I., Dennis, J.S., Howe, C.J., Scott, S.A. & Smith, A.G. 2010: Influence of nitrogen –limitation regime on the production by *Chlorella vulgaris* of lipids for biodiesel feedstocks. – *Biofuels*. 1: 47-58.
- Suutari, M., Leskinen, E., Fagerstedt, K., Kuparinen, J., Kuuppo, P. & Blomster, J. 2015: Macroalgae in biofuel production. – *Phycological Research*. Painossa.
- Underwood, A.J. 1980: The effects of grazing by Gastropods and physical factors on the upper limits of distribution of intertidal macroalgae. – *Oecologia*. 46: 201-213.
- Underwood, A.J. & Jernakoff, P. 1984: The effects of tidal height, wave-exposure, seasonality and rock-pools on grazing and distribution of intertidal macroalgae in New South Wales. – *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 75: 71-96.
- van Ginneken, V.J.T., Helsper, J., de Visser, W., van Keulen, H. & Brandenburg, W.A. 2011: Polyunsaturated fatty acids in various macroalgal species from north Atlantic and tropical seas. – *Lipids in Health and Disease*. 10: 104.
- Witman, J.D. 1987: Subtidal coexistence: storms, grazing, mutualism, and the zonation of kelps and mussels. – *Ecological Monographs*. 57: 167-187.

Liitteet

Liite 1. Koejärjestelmä elokuussa ja lokakuussa

Koejärjestelmä elokuussa (A) ja lokakuussa (B), kontrollikäsittely (C), typpi- (N), fosfori- (P) ja typpi- ja fosforilisäyskäsittelyt (N+P). Jokaisessa altaassa 5 g levää. Järjestely on satunnaistettu ja sama kuin Tvärminnen eläintieteellisen aseman akvaariohuoneessa.



Liite 2. Rasvahappojen metyyliestereiden sekoituksen koostumus (FAME 37)

FAME 37 sekoituksen koostumus, puhtaus 99 %, 10 mg/ml. Analysoitu pitoisuus = puhtaus x oletettu pitoisuus.

Rasvahappo	Suomeksi	Englanniksi	Oletettu pitoisuus µg/ml	Analysoitu pitoisuus µg/ml
C4:0	Butaanihappo	Butyric acid methyl ester	400,6	400,6
C6:0	Kapronihappo	Caproic acid methyl ester	400,4	396,4
C8:0	Kapryylihappo	Caprylic acid methyl ester	401	401
C10:0	Kapriinihappo	Capric acid methyl ester	400	400
C11:0	Undekaanihappo	Undecanoic acid methyl ester	201,6	200,6
C12:0	Lauriinihappo	Lauric acid methyl ester	402,2	402,2
C13:0	Tridekaanihappo	Tridecanoic acid methyl ester	202,4	200,4
C14:0	Myristiinihappo	Myristic acid methyl ester	402,6	397,8
C14:1	Myristoleiinihappo	Myristoleic acid methyl ester	202,2	200,2
C15:0	Pentadekaanihappo	Pentadecanoic acid methyl ester	200	199,4
C15:1	cis-10-Pentadekaanihappo	cis-10-Pentadecanoic acid methyl ester	201	199
C16:0	Palmitiinihappo	Palmitic acid methyl ester	601,4	601,4
C16:1	Palmitoleiinihappo	Palmitoleic acid methyl ester	201,6	199,6
C17:0	Heptadekaanihappo	Heptadecanoic acid methyl ester	201,8	199,2
C17:1	cis-10-Heptadekaanihappo	cis-10-Heptadecanoic acid methyl ester	200,8	198,8
C18:0	Steariinihappo	Stearic acid methyl ester	401,2	401,2
C18:1N9t	Elaidiinihappo	Elaidic acid methyl ester	200	200
C18:1N9c	Oleiinihappo	Oleic acid methyl ester	402,8	402,8
C18:2N6t	trans-Linolihappo (LA)	Linoelaidic acid methyl ester	202,6	202,6
C18:2N6c	cis-Linolihappo (LA)	Linoleic acid methyl ester	202,2	201
C18:3N6	Gammalinoleenihiappo (GLA)	γ- Linolenic acid methyl ester	201,4	199,4
C18:3N3	Alfalinoleenihiappo (ALA)	α-Linolenic acid methyl ester	201,6	199,6
C20:0	Arakidihiappo	Arachidic acid methyl ester	401,6	396
C20:1N9	Eikoseenihiappo	cis-11-Eicosenoic acid methyl ester	201,6	201,6
C20:2		cis-11,14-Eicosadienoic acid methyl ester	201,6	199,6
C20:3N6	Dihomo-gammalinoleenihiappo	cis-8,11,14-Eicosatrienoic acid methyl ester	200	198
C21:0		Heneicosanoic acid methyl ester	201,8	201,6
C20:4N6	Arakidonihiappo	Arachidonic acid methyl ester	201,6	199,6
C20:3N3		cis-11,14,17-Eicosatrienoic acid methyl ester	201,4	199,4
C20:5N3	Eikosapentaenihiappo (EPA)	cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid methyl ester	200,4	198,4
C22:0	Behenihiappo	Behenic acid methyl ester	401,6	399,2
C22:1N9	Eruka-happo	Erucic acid methyl ester	201,8	200,6
C22:2		cis-13,16-Docosadienoic acid methyl ester	201,2	199,2
C23:0		Tricosanoic acid methyl ester	201,8	200,8
C22:6n3	Dokosaheksaenihiappo (DHA)	cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid methyl ester	201,6	199,6
C24:0	Lignoseriinihiappo	Lignoceric acid methyl ester	401,8	399,4
C24:1N9	Nervonihiappo	Nervonic acid methyl ester	201,4	199,4